

ROVANA PALUDO TOYAMA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO ASSOCIADA A
CRIOLESÃO**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas.

**Florianópolis, SC.
2012**

ROVANA PALUDO TOYAMA

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UM MODELO
EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO ASSOCIADA A
CRIOLESÃO**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Médicas.

Coordenadora: Prof^ª. Dra. Márcia Margaret M. Pizzichini.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Marlene de Souza Pires

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Xikota

**Florianópolis, SC.
2012**

BANCA EXAMINADORA

Nome: TOYAMA, Rovana Paludo

Título: Avaliação Comportamental e Bioquímica de Camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação e anormalidades do desenvolvimento cortical.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Maria Marlene de Souza Pires

Prof^a. Dra. Márcia Margaret M. Pizzichini.

Prof. Dr. Rodrigo Leal

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e minha família que,
com amor, carinho e compreensão,
ajudaram-me a concretizar mais um
sonho....

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por prover tudo que preciso para ser feliz.

Ao meu esposo, Jeferson Toyama, companheiro nas horas difíceis. Por seu amor, experiência e sabedoria.

À Profa. Dra. Maria Marlene de Souza Pires, pela amizade, apoio e paciência durante a elaboração dessa dissertação. Por acreditar em minhas capacidades. Por ser uma grande inspiração para mim.

Ao Prof. João Carlos Xikota, agradeço a esmerada disponibilidade em cada telefonema, encontro, reunião, ajuda e apoio. Por tudo que me ensinou.

Ao Prof. Dra. Márcia Margaret Menezes Pizzichini, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, pela sua dedicação e trabalho para a reorganização do curso.

Aos meus pais, Jaime e Carmen, por me apoiar em toda jornada na busca pelo conhecimento.

A Kelly e Pedro pelas alegrias proporcionadas no ano de 2010 e 2011.

À querida amiga Elisa Marcon Baltazar, por todos os momentos em que precisei de sua ajuda.

À amiga MaíraJunkes Cunhae ..., por todo bom humor e carinho que sempre me dispensaram.

À amiga Laura Melton Morgan, por cada dia em que esteve comigo, principalmente nas horas de solidão (For all the days you were with me, especially the ones when I was feeling lonely).

Ao Professor Rui Prediger. Professor do Dpto de Farmacologia, Associado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências – CCB/UFSC.

A Professora Tânia Silvia Fröde. CCS – Dpto de Análises Clínicas e Imunologia do Hospital Universitário.

Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues. Centro de Ciências Biológicas. Dpto de Bioquímica. Agradeço pelo espaço concedido no Biotério do Grupo de Neuroquímica.

Ao colega Marcelo L. Schwarzbald, doutorando do Programa de Pós-graduação de Ciências Médicas, pela ajuda quando a experiência me faltava.

Agradeço ainda a Ziliani Buss, por todas as tardes em que estive nos auxiliando.

Agradeço a Daniele Guilhermano e Roberto Vieira. Aderbal Aguiar, Paulo Alexandre de Oliveira, Vanessa Valgas, Daniel Rial e Juliana Ben. Colegas do departamento de Bioquímica e Farmacologia.

Ao Sr. Ivo Dedicácio Soares, Chefe de Expediente do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelo seu apoio, amizade e dedicação ao serviço.

RESUMO

Estudos epidemiológicos com a população humana indicam que existe associação entre a ativação do sistema imune materno e o aumento do risco de dano no sistema nervoso central (SNC) da prole. A exposição a citocinas pró-inflamatórias específicas podem sensibilizar o cérebro e levar a má-formação do córtex cerebral possibilitando uma variedade de desordens neurológicas em crianças e adultos. **OBJETIVO:** Avaliar o impacto da inflamação perinatal em roedores submetidos à criolesão durante o desenvolvimento cortical. **METODO:** Fase 1: Uma única injeção intraperitoneal de LPS foi administrada no E18 nas concentrações de 50, 150, 300 µg/Kg. O grupo controle recebeu solução salina 0.9%. A temperatura corporal foi avaliada antes e 3 horas após o LPS. As gestantes foram submetidas ao teste do campo aberto 3 horas após administração da solução pirogênica e após testagem foram anestesiados para determinação leucocitária. Fase 2: Extração do líquido amniótico e soro materno para determinação dos marcadores de IL-1 e TNF- α (ELISA). Fase 3: Taxa de aborto: Após administração do LPS e solução salina, os animais foram monitorados para avaliação da taxa de aborto. Fase 4: Após LPS (150µg/Kg) no E18 as gestantes foram monitoradas até o parto onde foram separadas em 4 grupos distintos: *sham*, LPS, Criolesão (CL) e LPS + CL. Os filhotes no dia pós natal 0 (P0) foram submetidos a anestesia por hipotermia e receberam um corte na área do córtex somatossensorio primário. Os animais que foram submetidos à criolesão receberam além da anestesia e do corte a aposição de um bastão resfriado em nitrogênio líquido na área seccionada.

O comportamento destes animais foi avaliado na fase adulta com a aplicação dos seguintes testes: Campo aberto, Nado forçado, Labirinto em Y, Labirinto em Cruz Elevado e Suspensão pela Cauda. **RESULTADOS:** A administração intraperitoneal de LPS nas doses de 50, 150 e 300µg/Kg causaram hipotermia materna. Os níveis de neutrófilos 3 horas após a administração do LPS reduziram significativamente no grupo tratado com 300µg/Kg of LPS devido a hipotermia materna. Os grupos tratados com LPS mostraram redução significativa da atividade locomotora indicando comportamento doentio. Os níveis de IL-1 β e TNF- α no soro materno e líquido amniótico

comprovaram a presença de inflamação sistêmica. Os animais que sofreram hipotermia, submetidos ou não a inflamação, mostraram níveis de ansiedade significativamente maiores no teste do Labirinto em Cruz Elevado. Mais pesquisas são necessárias para avaliar o comportamento de ansiedade demonstrada pelos animais testados. O LPS leva ao comportamento doentio das gestantes, modifica a fisiologia do parto e pode levar a altas taxas de aborto de uma forma dose-dependente. O LPS também modifica os níveis séricos de marcadores pró-inflamatórios nos compartimentos maternos e fetais. O sorotipo E-coli 0111:B4 causa hipotermia nas gestantes.

PALAVRA-CHAVE: lipopolissacarídeo; criolesão; temperatura corporal; neutrófilo; ansiedade

ABSTRACT

Epidemiological studies with human populations indicate associations between prenatal immune activation and increased risk in offspring for central nervous system (CNS) disorders. The exposure to particular proinflammatory cytokines may sensitize the brain to hypoxic insults and that can lead to structural malformations of the cerebral cortex enabling a variety of neurological disorders in children and adults. **OBJECTIVE:** Evaluate the impact of perinatal inflammation in rodents subjected to freezing lesion during cortical development. **METHOD:** Phase 1: A single intraperitoneal injection of LPS was performed on gestational day E18. The aliquots of increasing concentration were 50, 150, 300 µg/Kg. The control group received pyrogen-free 0.9% isotonic saline. Body *temperature* was performed before and 3 hours after LPS administration. Animals were subjected to the open field test 3 hours after the endotoxin injection then anesthetized for maternal cardiac blood testing and determination of leukocyte, monocyte, lymphocyte and granulocyte levels. Phase 2: Maternal serum and amniotic fluid extraction was performed 3 hours after LPS injection for detection of the markers IL-1 and TNF- α (ELISA). Phase 3: Labor analysis: Following LPS injection, four animals of two treatment groups were monitored daily in single cages until delivery to evaluate the occurrence of abortion in each treatment group. Phase 4: Following LPS injection (150µg/Kg) on E18 maternal mice were monitored daily in single cages until delivery. Pups on postnatal day zero (P0) were separated into four distinct groups according to the treatment their mothers had received. Groups were divided as followed: Sham, LPS, Focal freezing lesion (FFL) and LPS+FFL. Pups whose treatment involved freezing lesion were subjected to the incision on the *primary somatosensory cortex area*. Male mice were allowed to become adults and then tested in behavioral tests such as the Open Field, Forced swim, Y maze, Elevated Plus Maze and Tail Suspension. **RESULTS:** Intraperitoneal administration of 50, 150 and 300µg/Kg of *E.coli* LPS elicited hypothermia in pregnant mice. Neutrophil levels were significantly different in the group that was treated with 300µg/Kg of LPS. Groups receiving LPS showed significantly less locomotion than the group receiving saline. IL-1 β and TNF- α were measured in maternal serum

and amniotic fluid and significant results were found proving the presence of maternal systemic inflammation model.

Animals which were subjected to hypothermia, independently of the inflammation, showed significant levels of anxiety in the Elevated Plus Maze Test. More researches are necessary to evaluate the anxiety behavior displayed by the animals of this research. LPS causes pronounced evidence of sickness behavior in pregnant mice, it modifies the physiology of gestation and might lead to abortion in a dose-dependent way. Furthermore, LPS modifies serum levels of pro-inflammatory markers observed in the maternal and in the intrauterine compartment. *E. coli* serotype 0111:B4 was observed to decrease body temperature leading to hypothermia.

KEY WORDS: lipopolysaccharide; freezing lesion; neutrophils; body temperature; anxiety

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Patogênese da corioamnionite	16
Figura 2. Mecanismo de ação do LPS em uma célula animal.....	18
Figura 3. Fase de testagem das doses de LPS, avaliação dos efeitos das doses sob a temperatura basal e comportamento doentio dos roedores. Extração de sangue, placenta e cérebro fetal para análise.....	31
Figura 4. Fase da determinação da interleucina 1β e TNF- α no soro e fluido amniótico dos animais tratados com a dose de 150 μ g/Kg e solução salina	33
Figura 5. Fase de determinação da taxa de aborto em animais testados com as doses de 150 μ g/Kg (n=4) e 300 μ g/Kg (n=4) de LPS	34
Figura 6. Indução de ADC em machos de 04 grupos experimentais distintos	35
Figura 7. Efeito do LPS (50 a 300 μ g/Kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) na temperatura de gestantes no dia embrionário E18	38
Figura 8. Efeitos do LPS (50 a 300 μ g/Kg) na atividade locomotora de gestantes	39
Figura 9. Efeito do LPS (50 a 300 μ g/Kg) administrado via intra peritoneal (i.p.) nos neutrófilos sanguíneos de gestantes	40
Figura 10. Distância Percorrida no Teste do campo aberto.....	42
Figura 11. Número de Entradas Centrais no Teste do campo aberto.	42
Figura 12. Tempo Gasto no centro da Arena no Teste do campo aberto.	43
Figura 13. Alteração Espontânea no Teste do labirinto em Y.....	43
Figura 14. Número de entradas nos braços fechados no Teste do labirinto em cruz Elevado.....	44
Figura 15. Número de entradas nos braços abertos no Teste do labirinto em cruz elevado.....	44
Figura 16. Tempo gasto nos braços abertos no Teste do labirinto em cruz elevado	45
Figura 17. Tempo de imobilidade após 2 minutos no Teste do Nado Forçado.....	45
Figura 18. Tempo de imobilidade em 6 minutos no Teste do Nado Forçado.....	46
Figura 19. Efeitos da criolesão induzida no primeiro dia pós-natal (P0) sobre o neocórtex de camundongos machos adultos (3 meses de idade). (a-b) observação macroscópica de animais <i>sham</i> e CL respectivamente. (c-d) imagens macroscópicas do encéfalo de animais LPS e LPS+ CL.	46
Figura 20. Área superficial dos encéfalos dos animais criolesados	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeito do LPS (150 µg/Kg) na IL-1β e TNF-α em camundongos gestantes.....	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	anormalidade do desenvolvimento cortical
CA	campo aberto
CL	criolesão
NF-KB	fator nuclear Kappa B
HC	hemiplegia congênita
IL-1b	interleucina1 beta
IL-6	interleucina 6
LCE	labirinto em cruz elevado
LPS	lipopolissacáride
LBP	proteína ligante de lipopolissacáride
MC	má formação cortical
NF	nado forçado
PMG	polimicrogiria
TLR4	toll-like receptor 4
TLY	teste do labirinto em Y
TNF-a	fator necrose tumoral alfa
TSC	teste de suspensão pela cauda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 INFLAMAÇÃO PERINATAL	15
1.2 PAPEL DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO DANO CEREBRAL.....	15
1.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS	17
1.4 ANORMALIDADES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL ..	19
1.5 NEUROPLASTICIDADE E ADC	21
1.6 JANELA DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL X LESÃO ..	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL:	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	27
3 MÉTODO	28
3.1. ANIMAIS E MÉTODOS.....	28
3.1.1 Animais	28
3.1.2 Aparatos.....	28
3.1.2.1 Campo Aberto	28
3.1.2.2 Teste do Nado Forçado (TNF)	29
3.1.2.3 Teste de Suspensão da Cauda (TSC)	29
3.1.2.4 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	30
3.1.2.5 Teste do Labirinto em Y	30
3.1.3 Drogas	31
3.1.4 Experimentos.....	31
3.1.4.1 Fase 1: Indução Inflamatória.....	31
3.1.4.1.1 <i>Análise Histopatológica</i>	33
3.1.4.2 Fase 2: Determinação das IL-1 β e TNF- α	33
3.1.4.3 Fase 3: Determinação da Taxa de Aborto	33
3.1.4.4 Fase 4: Indução Experimental de Anormalidades do Desenvolvimento Cortical: Criolesão	35
3.1.4.5 Análise Estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Fase 1: Estudo perinatal	38
4.1.1 Avaliação da Temperatura corporal	38
4.1.2 Taxa de aborto.....	38
4.1.3 Análise da Atividade locomotora.....	39

4.1.4 Determinação dos Níveis Leucocitários.....	39
4.1.5 Análise Histopatológica.....	40
4.2 FASE 2: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS De CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1β e TNF-α	41
4.3. FASE 3: ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS CUJAS MÃES RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS NA DOSE DE 150μG/KG E SOLUÇÃO SALINA COM ADIÇÃO DE UM SEGUNDO INSULTO – ISQUEMIA FOCAL ATRAVÉS DA CRIOLEÇÃO.	41
4.3.1 Teste do Campo Aberto	42
4.3.2 Labirinto em Y	43
4.3.3 Labirinto em Cruz elevado.....	44
4.3.4 Teste do Nado Forçado	45
4.3.5 Suspensão pela cauda.....	46
4.3.6 Análise Macroscópica do Encéfalo de camundongos machos na fase adulta	46
5 DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO PERINATAL

Evidências clínicas e experimentais mostram que a inflamação intrauterina é uma grande contribuinte não somente da prematuridade em seres humanos (nascimento antes das 37 semanas gestacionais) como também do aumento das chances de dano cerebral perinatal e originando distúrbios neurológicos crônicos^{1, 2}. Estes e outros autores³⁻⁵ afirmam que a ocorrência de episódios inflamatórios na fase neonatal pode alterar a conformação cerebral e envolver-se na fisiopatologia de algumas causas de esquizofrenia, autismo, paralisia cerebral, além de outras anormalidades do desenvolvimento, como dificuldade do aprendizado, epilepsia, problemas auditivos e visuais associados à leitura^{6, 7}.

Embora a gênese da prematuridade e do dano cerebral possa estar envolvida com processos inflamatórios relacionados às membranas coriônicas e a gestação em si, Sheiner *et al*⁸ aponta para outros eventos gestacionais menos notáveis que podem ser grandes contribuintes para o desenvolvimento de anormalidades cerebrais. Segundo este autor, a detecção de bacteriúria assintomática está ligada a várias complicações gestacionais sendo esta um fator independente de parto prematuro mesmo com tratamento apropriado. Da mesma forma, Smith *et al*⁹ propõe que processos inflamatórios de qualquer espécie e infecções bacterianas ou virais em gestantes levam a interferências no ambiente fetal podendo resultar em diversos danos a prole, isto por sua vez, levaria ao aumento da incidência de doenças mentais em outras fases do desenvolvimento.

1.2 PAPEL DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO DANO CEREBRAL

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, mais proeminentemente a interleucina 1 beta (IL-1 β)¹⁰, interleucina-6 (IL-6)⁹ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) parece estar estritamente envolvida na gênese do dano cerebral^{11, 12}.

A corioamnionite, inflamação das membranas coriônicas e amnióticas ainda não foi completamente descrita, e representa um impasse clínico devido à falta de conhecimento a respeito das etiologias específicas associadas a esta condição. Artigos recentes apontam que esta pode estar relacionada a eventos genéticos, epigenéticos, comportamentais, psicossociais, moleculares e fisiopatológicos ². A hipótese de que a invasão microbiana no coriôn e do âmnio durante a gestação pode levar ao lançamento de produtos bacteriológicos solúveis, chamados de endotoxinas, é bastante aceita. Estas endotoxinas aumentam a biossíntese das interleucinas por meio da ativação do sistema imune materno e dos tecidos gestacionais ¹³. A presença de mediadores inflamatórios tais como $\text{TNF-}\alpha$ ¹⁴ e $\text{IL-1}\beta$ foram descritas no fluído amniótico de pacientes que sofreram partos prematuros ¹⁵.

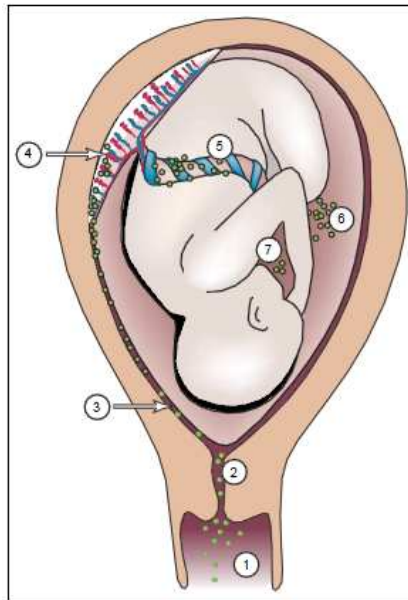


Figura 1: Patogênese da corioamnionite (Elovitz, 2004)¹⁶.

Na **figura 1**, os microcírculos (1) são representados pelas bactérias que se movem de forma ascendente (2) pela cérvice uterina. As bactérias então se multiplicam no espaço cório-decidual (3). Neste ponto, a resposta imune materna se inicia com a ativação de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias. As bactérias continuam a se propagar atravessando a placenta e sendo transportadas ao feto via

cordão umbilical (4-5). Estas bactérias podem ainda pular os passos (4-5), atravessar as membranas fetais pela degradação que causam a estas membranas, e entrar em contato com o líquido amniótico, sendo posteriormente aspiradas pelo feto (6-7). Tanto nas etapas (4-5) quanto nas fases (6-7), as citocinas pró-inflamatórias entram em contato com o feto levando-o ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória fetal (SRIF).

1.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Em recente revisão sobre modelos animais de inflamação perinatal Boksa et al ⁶ concluiu que a ocorrência de episódios inflamatórios na ausência de infecção pré-estabelecida parece estar tão ligada ao dano perinatal quanto a infecção em si, prova disto são os modelos de dano cerebral utilizando LPS (lipopolissacáride: endotoxina capaz de ativar o sistema imunológico e seus componentes). Em humanos, foram encontradas altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias presentes nos fluídos amnióticos de recém-nascidos com menos de 30 semanas de gestação cujas mães não necessariamente foram diagnosticadas com infecção ¹⁷.

Estudos animais que mimetizam a ocorrência de inflamação durante períodos específicos das janelas de desenvolvimento gestacional exaltam a influência crítica dos eventos imunológicos pré-natais sobre a vulnerabilidade do sistema nervoso ¹⁸⁻²¹. Modelos experimentais que visam avaliar os resultados da inflamação neonatal em outros estágios do desenvolvimento utilizam LPS como ativador do sistema imunológico.

O LPS é o componente principal da membrana externa de bactérias *gram* negativas. Sua função é proteger a bactéria contra agentes antibacterianos. Este heteropolímero é composto por duas partes, sendo uma hidrofóbica (tóxica) e a outra hidrofílica (polissacarídeo). Após a lise da célula bacteriana ou administração de LPS, esta endotoxina ativa o sistema imunológico: seus componentes interagem se ligando a superfície das células CD14 do sistema imunológico ⁴ que por sua vez ativa macrófagos a produzir citocinas pró-inflamatórias ¹⁴, enzimas, eicosanóides e radicais livres (responsáveis pela progressão das reações inflamatórias) ²². Monócitos, neutrófilos, plaquetas e células endoteliais também são ativadas após administração de LPS ²³.

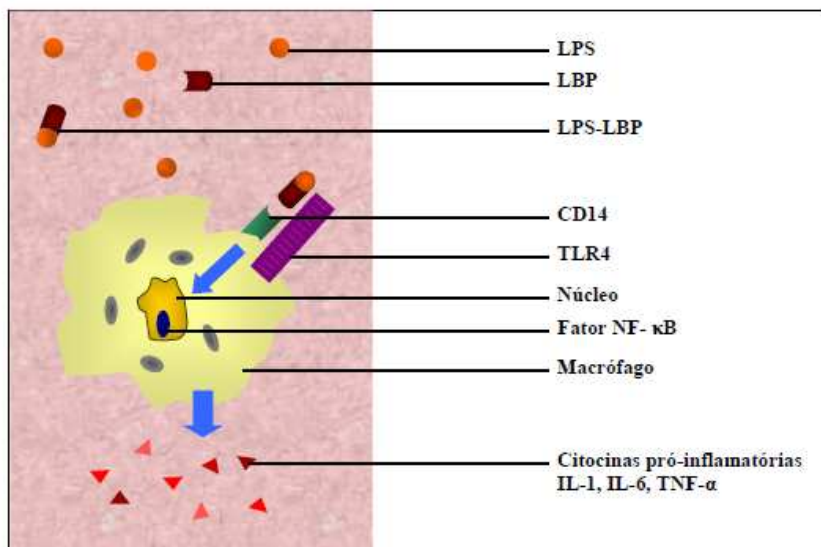


Figura 2: Mecanismo de ação do LPS em uma célula animal (Kirsten, 2008)²⁴.

Na **figura 2**, o LPS se liga as proteínas ligantes do lipopolissacáride (LBP) de seu hospedeiro, forma-se então o complexo LPS-LPB que entrará em contato com os receptores CD14 dos macrófagos e os Toll-like Receptors 4 (TLR4) iniciando a ativação celular com posterior produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α ²⁵. Em todo evento que envolve episódios inflamatórios ou infecciosos onde bactérias *gram*-negativas estão presentes, faz-se-a liberação de LPS ¹³. Esta endotoxina não somente reage como um ativador não específico do sistema imune, mas também influencia a função neuroendócrina e a atividade dos neurotransmissores centrais ²⁶. A presença de LPS no organismo inicia a produção e liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Uma vez liberadas, estas citocinas irão atuar no sistema nervoso através do nervo vago, dos órgãos circunventriculares (estas citocinas não têm o poder de atravessar a barreira hematoencefálica, e por isso entram em contato com o cérebro através destes órgãos, que por sua vez, não possuem barreira hematoencefálica) e em contato com células endoteliais do organismo levando-as a produção de eicosanóides (mediadores inflamatórios de origem lipídica) tais como as prostaglandinas ^{22, 27}.

Em modelos experimentais, roedores que recebem LPS podem vir a ter respostas sistêmicas diferentes tais como hiper ou hipotermia (reação dose-, sorotipo- e estado fisiológico-dependente)^{28, 29} e apresentar resposta comportamental compatível com a dose administrada e tempo de ação da mesma.

Dada a importância dos estudos que envolvem a gênese do dano cerebral relacionado às janelas de desenvolvimento do SNC, modelos animais são constantemente criados na tentativa de mimetizar episódios inflamatórios ocorridos em fase gestacional que, se somados a outros agravos, poderiam induzir ao desenvolvimento de anormalidades do desenvolvimento cerebral em humanos.

1.4 ANORMALIDADES DO DESENVOLVIMENTO CORTICAL

As anormalidades do desenvolvimento cortical (ADC) podem ser geradas através de dois determinantes principais: os geneticamente programados e aqueles relacionados a uma ou mais lesões ocorridas durante o desenvolvimento cortical durante a fase intra-uterina. As mutações genéticas, a ocorrência de adversidades no momento da gestação, a natureza e a extensão do insulto irão determinar a gravidade da malformação³⁰.

Em 1996, as ADC foram classicamente separadas em três grandes grupos, baseados nas primeiras fases do desenvolvimento cortical: defeitos de proliferação; defeitos de migração neuronal e erros na organização cortical³¹⁻³³.

As ADC são causas frequentes de epilepsia crônica e refratária ao tratamento farmacológico, dislexia e déficits neurológicos cognitivos e motores em crianças e adultos jovens³⁴. A hipóxia, isquemia, infecções congênicas e outras formas de lesão encefálica durante o período pré ou perinatal podem causar distúrbios da migração neuronal que determinam modificações irreversíveis^{35, 36}.

Por má-formação cortical (MC) pode-se entender a presença de um micro-sulco que se estende por todo o neocórtex formando uma região de quatro camadas ao invés das seis normais, com aumento no número de células gliais e diminuição grave do peso total encefálico e do volume cerebral³⁷⁻³⁹.

Embora a existência de modelos experimentais auxiliem a desvendar o processo de formação das displasias corticais, o conhecimento das ADC deve-se ainda, em grande parte, a estudos do

tecido cerebral de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia ⁴⁰. Estudos experimentais que visam mimetizar as ADC podem variar de acordo com o método e técnica empregados. O modelo de criolesão (CL), técnica onde um bastão resfriado em nitrogênio líquido é posicionado sobre uma incisão na calota craniana por alguns segundos, configura um bom modelo para produzir déficit de memória espacial e aprendizagem ⁴¹. Déficit da memória de curto prazo e processamento auditivo rápido foram descritos diante do emprego desta técnica ^{42, 43}.

Segundo Shimizu -Okabe et al ⁴⁴, animais submetidos a CL em P0 podem sofrer uma série de eventos nos primeiros dias de vida, que o levarão a um desfecho, de caráter positivo ou não, que se expressarão em outras fases de seu desenvolvimento. Ainda segundo estes autores, após CL, os roedores ficam mais suscetíveis a necrose cortical focal, imaturidade na homeostasia de cloretos, ação gabaérgica despolarizante, migração neuronal anormal e formação de uma rede neuronal desorganizada no foco microgírico.

Em humanos, lesões corticais sofridas durante o desenvolvimento pré-natal determinarão o grau de comprometimento das funções cerebrais dependendo da fase de maturação e desenvolvimento neuronal em que estas lesões ocorreram, ou seja, a fase em que se sofreu um insulto poderá determinar uma recuperação funcional discreta ou nula ⁴⁵. Lesões provocadas após o período de pico da formação dendrítica estão associadas com pouca recuperação funcional, mesmo em animais relativamente jovens ⁴⁶. Em roedores, o dano do córtex frontal durante o período da neurogênese, em geral, determina uma boa recuperação funcional, no entanto, lesões durante a primeira semana (P0-P6) de vida pós-natal estariam associadas a uma pobre recuperação funcional. As lesões provocadas na segunda semana de vida, período de máximo crescimento dendrítico e sinaptogênese intensa, estão associada a uma melhor recuperação ⁴⁷. Para Kolb e cols ⁴⁸, as lesões adquiridas durante a janela de desenvolvimento entre P1 e P6 resultariam em uma compensação funcional discreta. Este autor sugere ainda que possam existir múltiplos períodos críticos para a recuperação funcional após a lesão cortical.

A ocorrência de um insulto grave seria o suficiente para ocasionar uma lesão no cérebro imaturo, no entanto a soma de pequenos e múltiplos agravos poderia levar ao mesmo desfecho: a ocorrência simultânea de dano encefálico pela presença de uma infecção seguida de asfixia neonatal ou isquemia poderia levar a ADC ⁴⁹. Previamente, a asfixia ao nascer era considerada a principal causa de lesão encefálica perinatal e paralisia cerebral, no entanto, estudos realizados na década

passada mostraram que outras etiologias foram identificadas como sendo parte do grupo de causas que poderiam levar a ADC. Assim, podemos citar as infecções, doenças metabólicas, retardo de crescimento intra-uterino e coagulopatias como agentes isolados ou combinadas que podem interferir no desenvolvimento normal do SNC. Estudos clínicos e experimentais demonstram que o nascimento com asfixia é comumente precedido de infecção e que esta, por sua vez, está intrinsecamente associada ao desenvolvimento de lesão cerebral ^{3, 20, 50, 51}.

Uma das ADC freqüente observada em seres humanos é a polimicrogiria (PMG) caracterizada por irregularidades na superfície cortical e número excessivo de pequenos giros ⁵². Fundamentado em modelos animais, a PMG resulta de uma desordem do desenvolvimento que ocorre no período final da migração neuronal e fases iniciais da organização cortical ⁵³.

1.5 NEUROPLASTICIDADE E ADC

O dano cerebral, sendo este vascular, traumático, hipóxico ou degenerativo, resulta em uma cascata de eventos neuronais cuja extensão vai depender, até certo ponto, da natureza do insulto e da predisposição genética a certas doenças. É de comum consenso entre pesquisadores que a idade na qual um indivíduo sofre dano cerebral irá influenciar na gravidade das conseqüências das ADC e poderá determinar o grau de melhora ou não de habilidades motoras e neurocomportamentais ⁵⁴.

Por plasticidade cerebral entende-se a capacidade do sistema nervoso central de modificar sua estrutura e função ao longo do desenvolvimento após a ocorrência de um dano ⁵⁵. A plasticidade refere-se ainda a capacidade do SNC de responder de forma dinâmica ao ambiente através da modificação dos circuitos neuronais. Esta ocorre com maior freqüência nos estágios iniciais do desenvolvimento, e como a maioria dos processos biológicos, diminui sua atividade conforme o organismo envelhece ⁵⁶.

Na gestação, há várias janelas de desenvolvimento onde os neurônios são gerados e migram para áreas pré-determinadas. Uma vez que estes chegam ao seu ponto de destino iniciam o processo de conexão com grupos específicos de neurônios, formando, desta forma, redes neurais que irão assumir futuras funções ^{54, 57}. Cuidados maternos

e treinamentos ou estímulos específicos podem ser grandes “melhoradores” da conectividade neuronal ⁵⁴. Além destes, experiências pós-lesionais, dieta, farmacoterapia, e terapia com células tronco constituem fatores importantes em determinar um prognóstico mais favorável após tais lesões ⁵⁵.

Durante as fases de desenvolvimento embrionário, regulados por uma série de estágios precisos e pré-determinados envolvidos com uma seqüência complexa de processos de sobreposição, as estruturas cerebrais e camadas corticais são formadas. Este fato faz com que determinadas etapas embrionárias sejam consideradas críticas para o desenvolvimento de ADC. Influências ambientais e de ordem imunológica poderiam ter conseqüências graves para o desenvolvimento cerebral ⁵⁴.

Estas interferências ao longo do processo de desenvolvimento podem exercer efeitos de longa duração que se expressarão sob a probabilidade pronunciada ou atenuada do desenvolvimento de doenças físicas ou psiquiátricas. Estudos laboratoriais em roedores sugerem que experiências adversas na fase fetal ou durante o desenvolvimento pós-natal podem levar a mudanças na arquitetura e função cerebral que se expressam sob a forma de dificuldade no aprendizado e doenças psiquiátricas como a esquizofrenia ⁶. Fatores ambientais também exercem papel fundamental nesta mudança, um exemplo disso é a redução dos cuidados maternos durante o período neonatal: este fato pode alterar de forma significativa o nível de gravidade dos resultados ⁵⁶.

Evidências anatômicas sugerem que os mecanismos de ação de muitos tratamentos ocorrem devido a modificações na arborização dendrítica, na qual presumivelmente reflete mudanças na organização sináptica. Fatores que aumentam as modificações dendríticas, estimulam a compensação funcional, enquanto os fatores que bloqueiam ou retardam as modificações dendríticas impedem sua compensação ⁵⁸. Os neurônios sofrem modificações que se correlacionam com mudanças comportamentais. Estas modificações são acompanhadas de aumento do comprimento dendrítico, padrão da arborização, densidade e forma dos espinhos dendríticos, número de sinapses, tamanho e número de células gliais e atividade metabólica ⁴⁶.

Outro fator de grande influência para a função neuronal e organização cortical é a participação da atividade GABAérgica, durante o período pós-natal precoce, esta desencadeia respostas excitatórias nos neurônios corticais que na vida adulta determinam ação hiperpolarizante. Em modelos animais submetidos à criolesão observou-

se também a diminuição na sensibilidade dos receptores GABA_A, consistente com características de imaturidade celular neste modelo ⁵⁹, resultados similares foram confirmados por Cepeda e cols.⁶⁰ e Jansen et al⁶¹ encontrados em tecidos humanos com ADC. Essas modificações que envolvem a função GABAérgica ocorrem no início do desenvolvimento e são induzidas por alterações na homeostase do cloreto e desempenham um importante papel no desenvolvimento neocortical modulando a organização laminar e a sinaptogênese⁶². Lesões provocadas após o período de pico da formação dendrítica estão associadas com pouca recuperação funcional, mesmo em animais relativamente jovens ⁴⁶.

Em 2003, Gonzales e Kolb compararam vários estudos de dano cerebral e chegaram a conclusão que episódios isquêmicos na área do córtex motor aumentaram significativamente a atividade sinaptogênica na área contralateral do córtex motor e bilateral no córtex pré-frontal medial. Procedimentos da mesma natureza também levaram a sinaptogênese bilateral quando realizadas na região do estriado ⁶³.

Em seu estudo Kolb et al⁶⁴ relatou que animais submetidos a nenhum tipo de dano, porém em confinamento em ambientes denominados enriquecidos (contendo brinquedos, túneis e rodas para exercício), por aproximadamente um mês, aumentaram o peso cerebral em até 5%. O número de astrócitos, sinapses e angiogênese cerebral frente a estímulos positivos diários foi também um dos achados mais importantes da pesquisa ⁶⁴. O simples cuidado materno ao nascimento é igualmente importante para o desenvolvimento apropriado das estruturas cerebrais e parece ter relação direta com o comportamento dos animais. Estratégias como o uso de estimulação tátil pode melhorar a *performance* cognitiva e as funções motoras em uma variedade de modelos experimentais de dano cerebral incluindo os modelos de dano cortical por isquemia ⁶⁴.

Os mecanismos de recuperação após o desenvolvimento de ADC são variáveis. A recuperação funcional ou motora destas lesões depende de uma série de fatores: destes, a fase em que as ADC ocorreram, a propensão genética, a natureza do insulto e a frequência de estímulos positivos recebidos são fatores importantes a se considerar quando se aborda o tema da neuroplasticidade.

1.6 JANELA DO DESENVOLVIMENTO CEREBRAL X LESÃO

Na gestação, há várias janelas de desenvolvimento onde os neurônios são gerados e migram para áreas pré-determinadas; uma vez que estes chegam ao seu ponto de destino iniciam o processo de conexão com grupos específicos de neurônios, formando, desta forma, redes neurais que irão assumir futuras funções^{54, 57}.

Segundo Kolb et al⁴⁸ a existência de múltiplos períodos críticos durante o desenvolvimento cerebral podem ser a chave para a explicação do grau de recuperação funcional ou motora após uma lesão cortical.

Sabe-se que durante dias ou semanas após o estabelecimento de um dano iniciam-se atividades de processos degenerativos envolvidos na morte neuronal e na atrofia das sinapses nas regiões lesionadas. Com o passar do tempo, o processo degenerativo se estabiliza e dá-se início ao desenvolvimento de novas extensões neuronais na área afetada. Segundo Kolb et al, quase nada se sabe sobre a janela de tempo dentro deste processo cuja terapia de habilitação deveria ser iniciada⁶⁴.

As janelas de desenvolvimento cerebral em humanos e roedores são similares, porém com algumas particularidades principalmente envolvendo a duração das mesmas: Em seres humanos o estágio de proliferação neuronal inicia-se entre a 5ª e 6ª semanas gestacionais e se estende até 16ª – 20ª semanas (terceiro e quinto mês). A migração neuronal ocorre da 6ª – 7ª semanas até 20ª – 24ª semanas (o terceiro e quinto mês) e organização cortical dá início a partir da 16ª semana e se prolonga até a vida pós-natal^{35, 52}. A mielinização se dá durante o nascimento e prolonga-se até anos subseqüentes se estendendo até o início da adolescência⁷. Em roedores, a média de duração da gestação é de 19 dias. Embora as fases do desenvolvimento cerebral destes animais sejam extremamente rápidas, principalmente ao final da gestação e três semanas após o nascimento (período de amamentação), os roedores nascem com o cérebro mais imaturo do que um recém-nascido humano. Somente 7 a 13 dias após o nascimento, o cérebro de um roedor corresponderá ao de um ser humano recém-nascido a termo. Segundo Boksa, as primeiras e segundas metades da gestação de um roedor se aproximam do primeiro e segundo trimestres da gestação humana⁶. O desenvolvimento cortical de ratos recém-nascidos (P0-1) equivale aos 4 - 5 meses de gestação em humanos⁶⁵.

Desta forma, a ocorrência de algum dano hipóxico ou isquêmico por deficiências vasculares associadas à gemelaridade, infecção intra-uterina por citomegalovírus e outras formas de lesão cerebral, neste período podem causar desordens da migração neuronal e organização cortical, as quais determinariam modificações estruturais irreversíveis com possíveis prejuízos para as funções neuronais envolvidas³⁵.

O desenvolvimento do córtex cerebral consiste de zonas fetais transitórias, apresentando uma arquitetura laminar, onde a maior parte dos eventos celulares (proliferação, migração, morte celular, crescimento axonal, sinaptogênese) ocorrem em tempos específicos. O período de desenvolvimento cortical em seres humanos inicia-se em torno de 56 dias gestacionais e prolonga-se ao primeiro ano de vida com a formação das conexões neurais, desenvolvimento da cito arquitetura única (a estrutura correlacionada as áreas funcionais), crescimento da arborização dendrítica e o pico de formação das sinapses estendendo-se até 350 a 400 dias pós-natal⁶⁶.

O marco inicial da neurogênese em humanos ocorre aproximadamente no 33º dia embrionário (E33) na parte lateral da parede cortical⁶⁷ e no 10º dia embrionário (E10) em camundongos⁶⁸. Este processo é muito sensível a fatores físicos, químicos e agentes biológicos, bem como às mutações genéticas. Em humanos o pico da atividade migratória ocorre entre o terceiro e quinto mês gestacional e está completa durante o terceiro trimestre⁶⁹.

Um camundongo de sete a dez dias de vida teria um grau de maturação neurológica semelhante ao de um ser humano recém-nascido³⁵. Camundongos no período pós-natal imediato têm uma correspondência ao desenvolvimento cerebral humano da criança prematura (P5 no camundongo), recém nascido a termo (P8-10), lactente (P11-17), pré-púbere (P18-30), adolescente (P32-36) e adulto (P60) respectivamente⁷⁰.

Há diferentes graus de recuperação funcional e comportamental cujos determinantes estão relacionados à idade em que o insulto ocorre e a extensão das lesões: segundo Kolb et al⁷¹, o comportamento relacionado à navegação espacial aprendido e formação de memória mostrou-se mais favorável a recuperação funcional quando comparado a recuperação motora. Surpreendentemente a recuperação que menos se mostrou eficaz após um insulto foi a relacionada ao comportamento típico de cada espécie que parece ter se perdido juntamente com a lesão⁷¹.

O cérebro em desenvolvimento pode ser influenciado tanto por fatores pré- quanto pós-natais. Eventos relacionados ao estresse e estimulação sensorial bem como o uso de drogas, e a estimulação de hormônios gonadais e fatores de crescimento podem interferir na neuroplasticidade^{55, 71}.

Em estudos experimentais, o maior determinante de boa recuperação funcional e comportamental após um insulto é a experiência que os animais vivem em ambientes enriquecidos principalmente quando expostos logo após o desmame: para Kolb et al⁵⁵, a participação em atividades divertidas aumenta o número de sinapses no núcleo acumbens quando comparadas a animais privados de tal prática⁵⁵. De acordo com Gudsruk e Champagne⁵⁶, durante o desenvolvimento fetal e pós-natal o cérebro passa por rápidas e profundas mudanças levando a proliferação e refinamento das redes neurais. O período crítico dado por esta fase leva a uma janela de oportunidades nas quais determinadas experiências podem exercer um papel fundamental por toda a vida. Enfoques mais recentes mostram que a qualidade da interação entre aquele que recebe cuidado e seu cuidador pode induzir a alteração da expressão gênica em áreas cerebrais específicas. O impacto biológico da interação materna com o neonato tem sido explorado em animais de laboratório e achados sugerem que há variações naturais no cuidado dos neonatos, porém estas diferenças podem ser preditoras de mudanças neurobiológicas e comportamentais importantes⁵⁶.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram expostos a administração pré-natal sistêmica de LPS no dia 18 do período gestacional. Após nascimento (P0), entre 12 a 24 horas, foram submetidos à criolesão unilateral (hemisfério direito). Na vida adulta, os machos do grupo controle e os que sofreram insultos pré e pós-natais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação de atividade locomotora e exploratória (Campo Aberto) e avaliação da depressão e memória em testes como os testes de Nado Forçado e Suspensão pela Cauda bem como o teste de Labirinto em Y. Os animais foram ainda submetidos ao teste de Labirinto em Cruz Elevado para detecção de sinais de ansiedade. Posterior análise histológica foi realizada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar aspectos comportamentais e anatômicos em roedores adultos submetidos à inflamação perinatal associada à criolesão durante o desenvolvimento cerebral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Avaliar os efeitos comportamentais e imunológicos de uma única dose de LPS intra-peritoneal na gestação.
- b. Correlacionar os resultados da inflamação perinatal induzida pelo LPS acrescidos ou não de criolesão (*second hit*) e o desfecho comportamental (motricidade, memória e emocionalidade) na vida adulta.
- c. Investigar alterações anatômicas determinada pela inflamação associada à criolesão durante o processo de maturação morfológico e funcional do cérebro.
- d. Comparar o tamanho da área superficial e extensão da displasia cortical focal em animais que receberam LPS no período perinatal e foram submetidos ou não à criolesão.

3 MÉTODO

Desenho de estudo - Pesquisa básica, experimental, tipo estudo de coorte intervencional.

3.1 ANIMAIS E MÉTODOS

3.1.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus* de linhagem *swiss* de cor branca gestantes. As fêmeas grávidas eram recebidas do biotério Central da UFSC no período gestacional de 15 dias (E15). O dia do acasalamento foi considerado o dia 0 (zero) de gestação sendo representado nesta dissertação por E0. Os animais foram abrigados em caixas de polipropileno forradas com maravalha e mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 graus Celsius sob o ciclo claro e escuro (luz das 7 às 19 horas). Ração e água eram fornecidos *ad libitum*.

Todos os experimentos realizados envolvendo animais foram executados em concordância e mediante aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina Protocolo PP0057, data 18/11/2010. O cuidado com o manejo e uso destes animais seguiu um padrão rígido de controle com o objetivo de minimizar o sofrimento.

3.1.2 Aparatos

3.1.2.1 Campo Aberto

Teste do Campo Aberto (CA): Dados comportamentais foram coletados através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato e analisadas posteriormente. O aparato de cor cinza, feito de madeira, possui as seguintes medidas 30cm×30cm (dividido por linhas brancas cujos quadrados possuem 10cm×10 cm), suas paredes possuem 15 cm de altura. Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux).

Cada roedor é posicionado no centro da arena e o número de quadrados cruzados, tempo gasto no centro da arena e distância percorrida são documentados⁷¹. Para limpeza do aparato usa-se solução de álcool 5% cada vez que um novo animal é testado. A limpeza minimiza os efeitos dos odores que o animal anterior produz. A entrada de um animal em um quadrado é quantificada quando o roedor entra neste com as quatro patas.

3.1.2.2 Teste do Nado Forçado (TNF)

O teste do nado forçado é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar atividade depressiva em roedores. O método original foi descrito por Porsolt⁷² e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial, eles adotam uma postura de imobilidade. O cilindro é de vidro e possui 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux). O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O tempo em que o animal permanece no cilindro é de 6 minutos. Quanto maior o tempo de imobilidade, mais se pode sugerir que o animal possui tendência a depressão. A redução no tempo de imobilidade será o efeito observado após a administração aguda de várias classes de fármacos antidepressivos⁷².

3.1.2.3 Teste de Suspensão da Cauda (TSC)

O TSC e o tempo total de duração da imobilidade foram baseados no protocolo descrito por Steru et al⁷³. Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux). Trata-se de um teste onde o camundongo é suspenso pela cauda por meio de fita adesiva a 50 cm acima do chão. Neste teste é medido o tempo de imobilidade de animal durante 6 minutos. Quanto maior o tempo de imobilidade, mais se pode sugerir que o animal possui tendência a depressão.

3.1.2.4 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é utilizado por sua habilidade de detectar ansiedade em roedores⁷⁴.

Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux). O aparato é feito de madeira coberto com fórmica impermeável colocado a 60 cm acima do chão. Os quatro braços possuem 18 cm de comprimento e 6 largura. Dois dos braços são opostos um ao outro e cercados por paredes que possuem 6 cm de altura, enquanto que os outros 2 braços são abertos, isto é, não possuem parede para cercá-los. Os quatro braços são conectados por uma plataforma central de 6 cm×6 cm.

Cada roedor é posicionado no centro do aparato e observado por 5 minutos. O efeito ansiogênico é observado quando o animal passa a ter mais entradas nos braços fechados do aparato do que nos abertos. O aparato deve ser limpo com solução de álcool 5% cada vez que um novo animal é testado. A limpeza minimiza os efeitos dos odores que o animal anterior possa produzir. Toda vez que um animal entra com as quatro patas em qualquer um dos braços, uma entrada é computada. O número total de entrada nos braços abertos versus os braços fechados sugere ansiedade.

3.1.2.5 Teste do Labirinto em Y

O Teste do Labirinto em Y consiste em avaliar a capacidade de memória espacial de roedores. Este teste verifica se o roedor mantém na memória o espaço que acabou de explorar. Os experimentos são conduzidos em um ambiente com atenuação de sons e luz de baixa intensidade – cor vermelha (12 lux).

O roedor é posicionado no fim do braço em Y (posição central do aparato) e fica livre para explorar os 3 braços por 8 minutos, sendo que destes, os 2 primeiros minutos são para habituação e os outros 6 para o teste.

3.1.3 Drogas

O LPS (derivado da *E. coli* sorotipo 0111:B4, número L-2630; Sigma, St. Louis, MO) foi recebido em forma de pó liofilizado e então diluído em solução salina isotônica de 0.9%. Após a diluição, o LPS foi sonificado (Jeken ® sonicator Modelo PS-08A 1.3L) por 1 minuto e congelado a freezer a -18°C em alíquotas crescentes de concentração (50, 150, 300 $\mu\text{g/Kg}$).

Quando administrada, a solução salina 0.9% foi equivalente ao volume injetado do LPS. Ao serem utilizadas, estas alíquotas eram descongeladas, sonificadas por 1 minuto e então administradas em uma dose única. As injeções tanto de LPS quanto de solução salina foram administradas via intraperitoneal e feitas em um volume de $100\mu\text{L}$ (volume específico para o peso de um camundongo adulto (aproximadamente 40 gramas)).

3.1.4 Experimentos

3.1.4.1 Fase 1: Indução Inflamatória

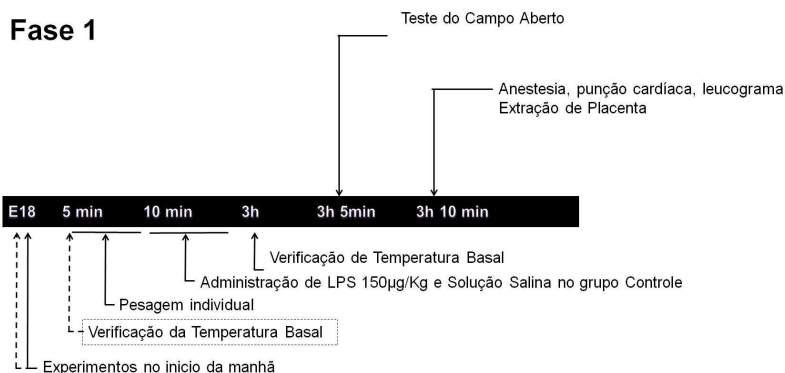


Figura 3: Fase de testagem das doses de LPS, avaliação dos efeitos das doses sob a temperatura basal e comportamento doente dos roedores. Extração de sangue e placenta para análise.

Cinquenta e dois animais foram utilizados para esta fase dos experimentos. Estes animais foram divididos da seguinte maneira: n= 16 (salina), n=10 (LPS 50µg/Kg), n=16 (LPS 150µg/Kg) e n=10 (LPS 300µg/Kg).

Três dias antes dos experimentos, os animais foram manipulados para se familiarizarem-se com os procedimentos experimentais. Esta manipulação permitiu que os animais se habituassem ao contato e desta forma reduzir o estresse envolvido no dia da experimentação. Segundo Fewel et al ²⁹ o estresse pode alterar a temperatura basal levando ao aumento da mesma.

No dia dos experimentos, os roedores foram randomicamente escolhidos e, marcados para pertencerem a 1 dos 4 grupos: (1) Salina, (2) 50µg/Kg, (3) 150µg/Kg and (4) 300µg/Kg.

O controle da temperatura ambiente foi feito através de climatizador mantendo-a em 22±2 °C. A verificação da temperatura dos animais foi realizada com termômetro infravermelho (Microlife® modelo FR1DM1, Clearwater, Florida,) posicionado na região ventral. Cada animal foi pesado (Balança Toledo ® Modelo EB211 para biotério) para determinação da dose correta de LPS.

Uma única injeção intraperitoneal foi administrada no E18 – período que representa 94% da média de gestação para um camundongo (Camundongos *Swiss* geralmente nascem entre 19 e 21 dias de gestação). Três horas após a administração do LPS, a temperatura dos animais foi novamente verificada e registrada. Os animais foram então submetidos a teste comportamental 3 horas após aplicação do LPS para avaliação de comportamento doentio decorrentes dos picos de inflamação ⁷⁵. Imediatamente após o teste comportamental os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (100/10mg/kg i.p.) para punção cardíaca e determinação dos níveis de leucócitos, monócito, linfócito e granulócito. Para este procedimento os animais foram submetidos à toracotomia *in vivo* e extração de 1mL de sangue a ser analisado pelo analisador hematológico (BC- 2800 VET ®, Auto Hematology Analyser, Mindary, China).

Todos os experimentos foram executados durante o ciclo claro e iniciaram às 8 horas da manhã para evitar variações circadianas que pudessem influenciar a temperatura basal. Após tal procedimento que culmina com inevitável eutanásia do animal, uma laparotomia na linha média abdominal foi realizada para expor as trompas uterinas. O líquido amniótico foi extraído e os fetos removidos rapidamente sendo sacrificados por decapitação. As placentas foram fixadas em paraformaldeído 4% para posterior análise histopatológica.

3.1.4.1.1 Análise Histopatológica

O tecido foi fixado em formalina 4% entre 12 – 24 horas após a extração. Todas as peças foram mensuradas e pesadas durante o exame macroscópico. Levando em consideração o maior eixo longitudinal, as placentas foram seccionadas em intervalos de 3 milímetros e enumeradas de acordo com a posição das mesmas na direção ântero-posterior. Todas as secções foram analisadas. As secções eram rotineiramente processadas com concentração crescente de etanol, xilene e embebidas em parafina líquida. Todas as peças foram cortadas em uma espessura de 4 micrômetros com um microtomo (Leica Buffalo Grove, IL, USA), esticadas em água a 60°C e montadas em lâminas cobertas com silane. As lâminas eram secas em incubadora e desparafinadas em concentrações descendentes de álcool e rotineiramente coradas com hematoxilina e eosina (HE). Todas as análises histopatológicas foram realizadas utilizando-se um foto-microscópio (Optika B-350 Barcelona - Espanha) acoplado a uma câmera digital (Optika B5 Roseland, NJ, USA).

3.1.4.2 Fase 2: Determinação das IL-1 β e TNF- α

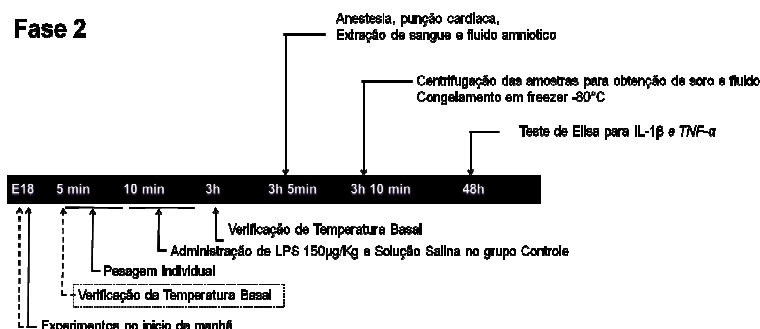


Figura 4: Fase da determinação da interleucina 1 β e TNF- α no soro e fluido amniótico dos animais tratados com a dose de 150 μ g/Kg e solução salina.

Os experimentos se deram no início da manhã com um $n=8$ gestantes. A dose de $150\mu\text{g/Kg}$ de LPS foi administrada por via intraperitoneal e três horas após a administração da dose os animais foram eutanasiadas por excesso dos anestésicos Ketamina e Xilazina ($100/10\text{ mg/kg}$, i.p.). Os animais foram submetidos a toracotomia *in vivo* para extração de 1mL de sangue que foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro. Aproximadamente 1mL de líquido amniótico foi obtido dos sacos gestacionais e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Para a análise dos marcadores inflamatórios foi realizado um pool do soro e líquido amniótico após centrifugação. As amostras extraídas foram estocadas a -80°C até a análise.

O soro e o fluido amniótico foram utilizados para a detecção dos marcadores de IL- 1β e TNF- α . Os níveis das citocinas foram mensurados através do ensaio de ELISA, com a utilização de *kits*. As faixas de variação detectados pelos ensaios foram: IL- $1\beta=1,67\text{ pg/mL}$ e TNF- $\alpha=5,0\text{ pg/mL}$. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio (CV) para IL- 1β e TNF- α foram CV: IL- $1\beta= 6.2 \pm 0.4\%$ e TNF- $\alpha= 7.8 \pm 0.9\%$; e inter CV: IL- $1\beta=5.1 \pm 0.6\%$ e TNF- $\alpha= 9.6 \pm 2.1\%$, com valores de sensibilidade de IL- $1\beta=1.7\text{ pg/mL}$ e TNF- $\alpha=5.0\text{ pg/mL}$. As leituras de todas citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram realizadas em leitor de ELISA (Organon-Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores são/foram expressos em pg/mL .

3.1.4.3 Fase 3: Determinação da Taxa de Aborto

Fase 3

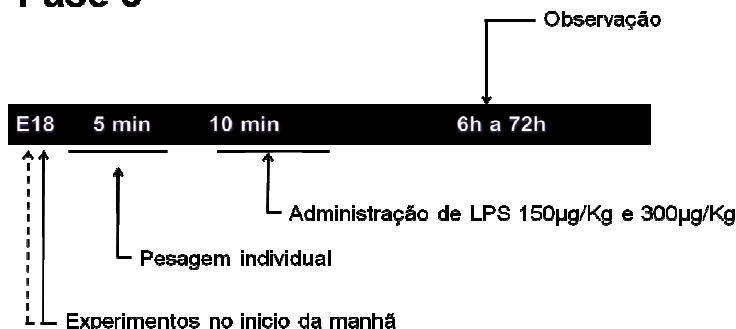


Figura 5: Fase de determinação da taxa de aborto em animais testados com as doses de $150\mu\text{g/Kg}$ ($n=4$) e $300\mu\text{g/Kg}$ ($n=4$) de LPS.

Oito animais foram utilizados para determinar a taxa de aborto após a administração das doses de $150\mu\text{g/Kg}$ ($n=4$) e $300\mu\text{g/Kg}$ ($n=4$) de LPS. Os animais deste estudo receberam LPS na idade gestacional de 18 dias, fato este que impede que denominemos qualquer nascimento, mesmo logo após administração da solução pirogênica, de prematuro. Devido a este fato, todos os nascimentos ocorridos após E18 serão classificados como a termo.

Após administração de ambas as soluções, os animais foram monitorados em caixas separadas até o momento do parto. A dose de $50\mu\text{g/Kg}$ não foi testada nesta fase dos experimentos devido ao fato que se buscava resultados mais encorpados com relação aos efeitos do LPS na prole. Estes animais, gestantes e filhotes, foram sacrificados posteriormente.

3.1.4.4 Fase 4: Indução Experimental de Anormalidades do Desenvolvimento Cortical: Criolesão

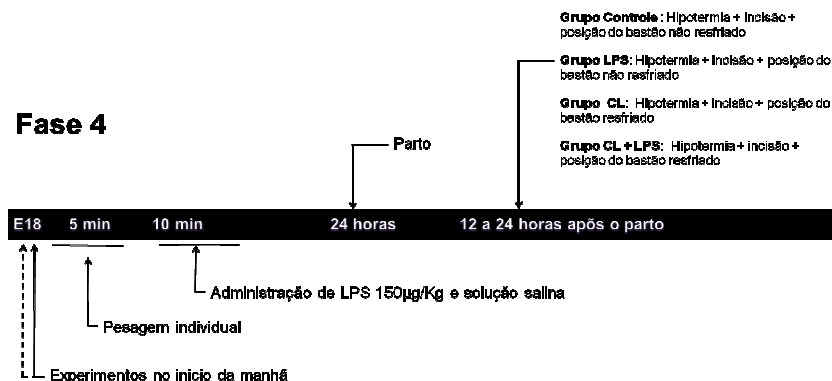


Figura 6: Indução de ADC em machos de 4 grupos experimentais distintos

Após a realização da curva dose-tempo resposta relacionada à observação da inflamação nos compartimentos maternos (plasma e membranas amnióticas) e fetais (encéfalo), deu-se seguimento a indução do *second hit*.

Logo após o parto, programado para ocorrer entre E18 e E21 no período pós-natal P0 (entre 0 – 24ª hora de vida), os filhotes foram anestesiados por um processo de hipotermia, técnica descrita por Phifer e Terry (1986), e padronizada para este estudo: os roedores foram

colocados em contato indireto com água a 4°C por um período de 12 minutos e foi observado o grau de mobilidade e reação a estímulos dolorosos⁷⁶.

Já com o animal devidamente anestesiado, seguimos o modelo de indução de anormalidades do desenvolvimento cortical descrito por Luhmann e Raabe (1996): o escalpo, recobrimdo a região frontoparietal, já seccionado ao longo da linha média, para a obtenção de um acesso cirúrgico de 5 a 7mm, com uma lâmina de bisturi n.º 11 recebeu um bastão de aço com três pontas, cada qual com o diâmetro de 1 mm e separadas entre si por 1mm. O mesmo foi resfriado, por imersão em nitrogênio líquido, e colocado em contato com a calvária exposta dos roedores, sobre a área do córtex somatossensorio primário por 10 segundos³⁶. O diâmetro do bastão e o tempo de exposição foram definidos através de observação macroscópica e microscópica (coloração de hematoxilina-eosina) prévia das lesões induzidas em camundongos no estudo experimental prévio^{43, 77}. Os animais foram selecionados em grupo falso-operado (“*sham*”) (n=12), LPS sem criolesão (12), LPS acrescidos de criolesão unilateral (n = 13) e apenas criolesão unilateral (n = 10). Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados com suas mães em suas gaiolas para a recuperação anestésica.

Ao desenhar este modelo experimental, buscou-se avaliar os efeitos de uma possível sensibilização do SNC através da inflamação (LPS 150µg/Kg) ainda em fase gestacional e posterior insulto isquêmico no primeiro dia de vida pós-natal com o uso da criolesão. A caracterização de uma inflamação em fase embrionária e a ocorrência de um segundo dano após o nascimento não foi descrito em literatura até o momento.

É importante ressaltar que os animais de todos os grupos foram submetidos à anestesia por hipotermia e corte na área do córtex somatossensorio no hemisfério direito com posição do bastão de 3 pontas sobre a área lesionada por 10 segundos. Somente os animais denominados de criolesados receberam a aposição do bastão com temperatura de -180 graus Célsius (resfriado em nitrogênio líquido). Na vida adulta os quatro grupos foram avaliados com relação ao comportamento sendo observada a atividade locomotora, memória, ansiedade e depressão.

3.1.4.5 Análise Estatística

A análise dos dados se deu pela análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias. As comparações múltiplas foram realizadas através do teste post-hoc de Newman-Keuls (STATISTIC®). A análise dos dados contínuos de distribuição não normal: análise não paramétrica foi realizada pelo teste Kruskal-Walis seguido do teste post-hoc de Dunn. O software utilizado para a confecção dos gráficos e análise estatística foi o Graph Pad Prism 4® GraphPad Software Inc.

4 RESULTADOS

4.1 Fase 1: Estudo perinatal

4.1.1 Avaliação da Temperatura corporal

A administração intraperitoneal de LPS 50, 150 e 300µg/Kg induziu hipotermia nas gestantes. A duração da hipotermia não foi avaliada, porém confirmou-se a diminuição da temperatura 3 horas após a administração do lipopolissacáride. Os dados apresentados na **Fig. 7** indicam que o grupo de animais que receberam LPS difere do grupo controle [$F(14,7) = 0.62$, $p < 0.0001$].

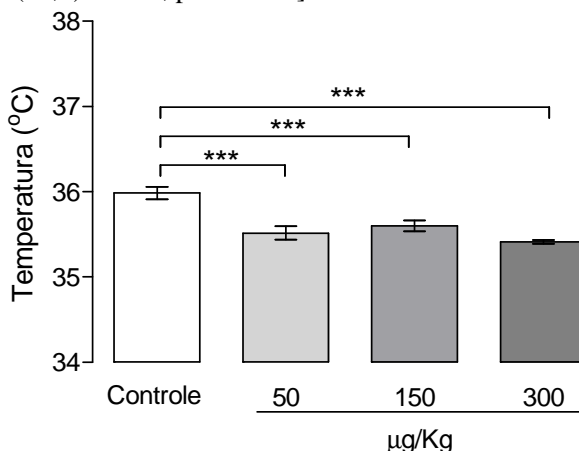


Figura7. Efeito do LPS (50 a 300 µg/Kg) administrado por via intraperitoneal (i.p.) na temperatura de gestantes no dia embrionário E18. C = controle = Animais tratados somente com solução salina (NaCl 0.9%, i.p.) *** $p < 0.0001$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo)

4.1.2 Taxa de aborto

Ambas as doses testadas revelaram um número expressivo de taxas de aborto: os animais tratados com a dose de 150µg/Kg apresentaram 55% de aborto espontâneo e os tratados com 300µg/Kg

apresentaram 100 % de aborto. Não houve evidências de mortalidade materna em nenhuma das doses citadas.

4.1.3 Análise da Atividade locomotora

Os dados presentes na **Fig. 8** indicam os efeitos do LPS na atividade locomotora dos roedores. Os resultados demonstram que os roedores que receberam LPS nas doses de 50, 150, e 300µg/Kg diminuíram a distância percorrida em 39,5%, 47,8% e 63,6% respectivamente, e esta redução se deu de forma dose-dependente [$F(7,26) = 0.44$, $p < 0.001$]. O número de linhas cruzadas e o tempo gasto no centro da arena não demonstraram significância estatística em nenhum dos grupos estudados (resultados não mostrados).

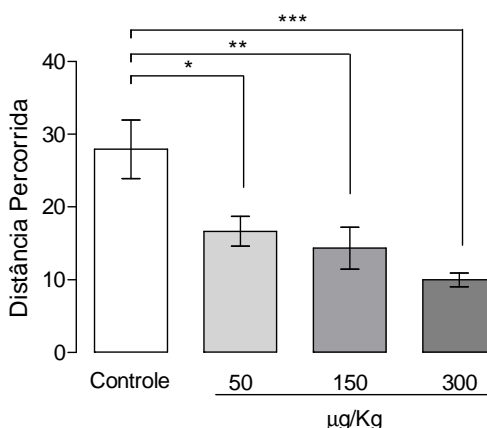


Figura 8. Efeitos do LPS (50 a 300 µg/Kg) na atividade locomotora de gestantes * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Controle = animais tratados somente com solução salina (NaCl 0.9%, i.p). Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.1.4 Determinação dos Níveis Leucocitários

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa dos grupos tratados com LPS nas doses de 50µg/Kg, and 150µg/Kg em relação ao grupo controle para leucócitos [$F(2,31) = 0.20$, $p = 0.098$], monócitos [$F(2,40) = 0.21$, $p = 0.0892$] e linfócitos (1,16)= 0.11, $p =$

0.341] (resultados não mostrados). Houve uma redução significativa de 74% dos neutrófilos no grupo que foi tratado com 300 μ g/Kg [F (3,99) = 0.30, p = 0.018] quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

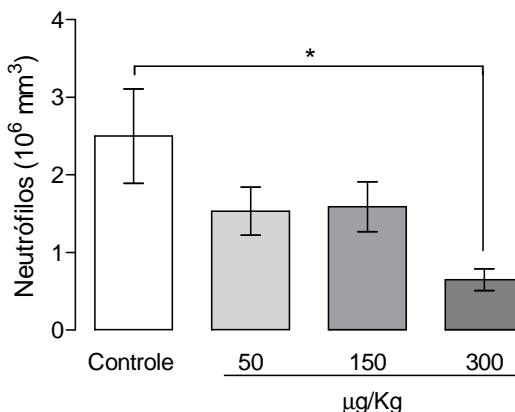


Figura 9: Efeito do LPS (50 a 300 μ g/Kg) administrado via intraperitoneal (i.p.) nos neutrófilos sanguíneos de gestantes. Controle = animais tratados somente com solução salina (NaCl 0.9%, i.p.) *p < 0.05 Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.1.5 Análise Histopatológica

Os resultados da análise histopatológica da placenta não foram estatisticamente significantes em nenhum dos grupos tratados (dados não mostrados). Não foram observadas alterações na análise macroscópica longitudinal, transversal ou na espessura das placentas avaliadas dos diferentes grupos. Na avaliação microscópica, a presença de infarto, modificação dos vasos sanguíneos, infiltrado e intensidade neutrofílico, infiltrado e intensidade linfocítica, presença de histiócitos, análise das membranas amnióticas, corioamnionite, funisite, amnionite e deciduíte não se mostraram diferentes entre os grupos bem como não apresentaram nenhuma alteração inflamatória.

4.2 FASE 2: DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS De CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 β e TNF- α

Uma vez que os animais tratados com LPS na dose de 300 μ g/kg apresentaram 100% de aborto, inviabilizando o estudo comportamental da prole na vida adulta, a dose utilizada para a determinação de IL-1 β e TNF- α no soro materno e liquido amniótico escolhida foi de 150 μ g/Kg. Os resultados demonstraram que o LPS causou elevação significativa nos níveis de ambas interleucinas IL-1 β e TNF- α tanto no soro materno quanto no liquido amniótico: IL-1 β soro [t=43330 df=6 (p<0,0001)], liquido amniótico [t=6838 df=6 (p<0,0001)] (8.65 e 1.27 vezes maior respectivamente), e TNF- α soro [t=233800 df=6 (p<0,0001)] e liquido amniótico [t=276000 df=6 (p<0,0001)] (33,2 e 25,5 vezes maior respectivamente) quando comparado ao grupo controle (tabela 2).

TAB.1 Efeito do LPS (150 μ g/Kg) na IL-1 β e TNF- α das gestantes.

Amostra	Interleucina IL-1 β (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)	
	Controle	LPS 150	Controle	LPS 150
Soro	32,68	282,76*	35,38	1175,29*
Líquido Amniótico	144,55	184,04*	64,84	1653,94*

*p <0,0001 quando comparados ao respectivo grupo controle. Controle = animais tratados somente com solução salina (NaCl 0.9%). Teste T não pareado. (N = mínimo de 4 animais por grupo).

4.3. FASE 3: ESTUDO COMPORTAMENTAL DOS ANIMAIS CUJAS MÃES RECEBERAM TRATAMENTO COM LPS NA DOSE DE 150 μ G/KG E SOLUÇÃO SALINA COM ADIÇÃO DE UM SEGUNDO INSULTO – ISQUEMIA FOCAL ATRAVÉS DA CRIOLESAO.

Para esta fase dos experimentos foram estudados 04 grupos, sendo estes 1) Controle; 2) LPS; 3) CL; e 4) LPS + CL. Os machos de todos os grupos foram submetidos a testes comportamentais na fase adulta (P120 – 130).

4.3.1 Teste do Campo Aberto

Apesar da extensão e do envolvimento da lesão cortical de áreas relacionadas à atividade motora não foram observados efeitos significativos de nenhum dos tratamentos (Figura10), portanto não houve redução ou restrição da locomoção em nenhum dos grupos ANOVA [F 0,19=0,13, $p=0.89$]. Os parâmetros avaliados foram distância total percorrida, número de cruzamentos das linhas centrais e tempo total gasto no centro da arena.

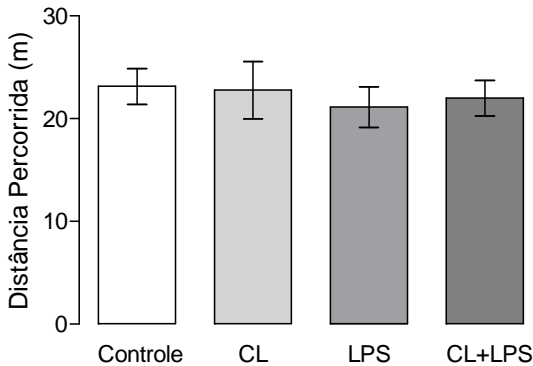


Figura 10: Distância Percorrida Controle = Teste do campo aberto. $p < 0.89$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

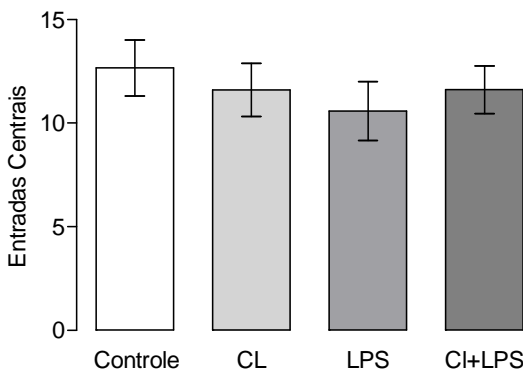


Figura 11: Número de Entradas Centrais = Teste do campo aberto. $p < 0.73$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

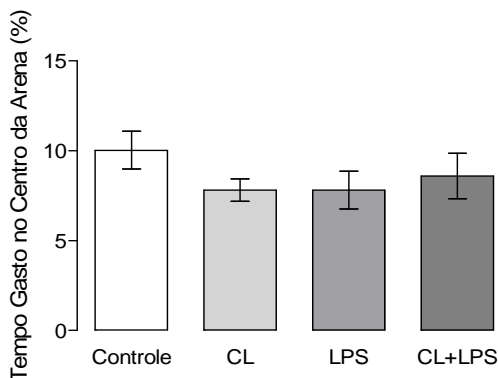


Figura 12: Tempo Gasto no centro da Arena = Teste do campo aberto. $p < 0.42$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.3.2 Labirinto em Y

O Labirinto em Y consiste de um teste que avalia a capacidade de memória espacial de roedores. Diante deste teste, o grupo LPS+CL mostrou uma tendência à déficit de memória espacial quando comparado ao grupo que recebeu somente LPS ANOVA [F 2,59=0,15, $p=0.06$] e post hoc Newman-Keuls. Os demais grupos não divergiram entre si.

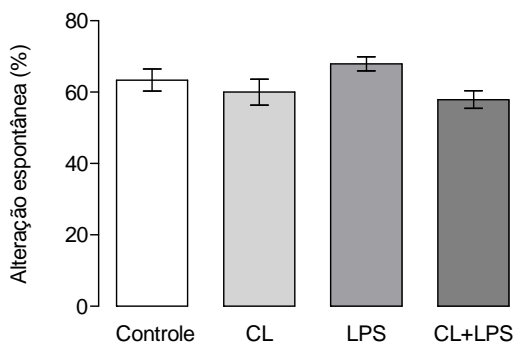


Figura 13: Alteração Espontânea = Teste do labirinto em Y. $p < 0.06$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.3.3 Labirinto em Cruz elevado

O Labirinto em Y consiste de um teste que avalia a ansiedade. O número de entradas nos braços fechados, dado que mede atividade locomotora, não divergiu entre os grupos testados [$F_{1,28}=0,08$, $p=0,29$]. O número de entradas e tempo gasto nos braços abertos mostrou-se diferentes entre os grupos estudados [$F_{5,84}=0,28$, $p<0,001$] e [$F_{3,17}=0,18$, $p<0,03$] respectivamente. Nas figuras 15 e 16 observamos que tanto o grupo (controle), bem como o grupo que recebeu LPS demonstra-se mais ansiosos que os demais grupos.

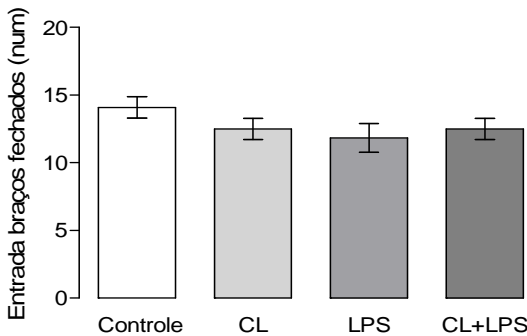


Figura 14: Número de entradas nos braços fechados = Teste do labirinto em cruz elevado. $p<0,29$. Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

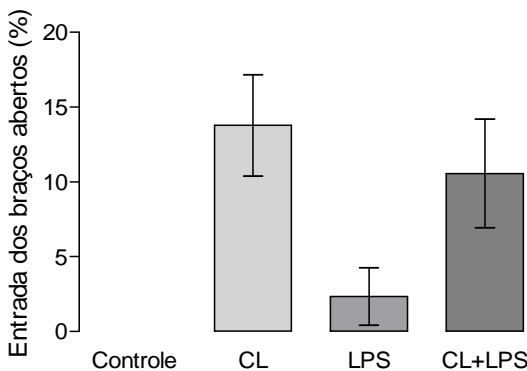


Figura 15. Número de entradas nos braços abertos= Teste do labirinto em cruz elevado. $p < 0,001$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

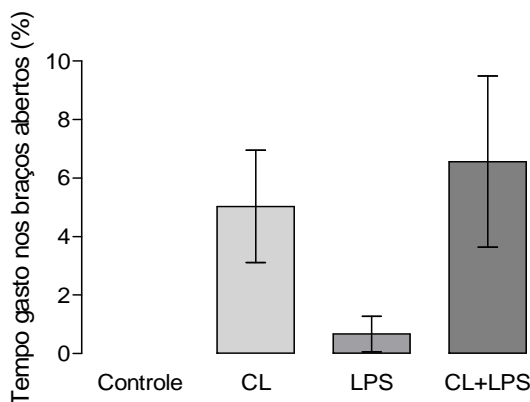


Figura 16. Tempo gasto nos braços abertos= Teste do labirinto em cruz elevado. $p < 0.03$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.3.4 Teste do Nado Forçado

A comparação do tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1977) entre os grupos durante permanência no cilindro não foi suficiente para sugerir que algum dos tratamentos aplicados fosse sugestivo de estado depressivo. Não foi observada significância estatística no número de entradas nos braços fechados entre os grupos testados: ANOVA [$F_{1,28}=0,08$; $p=0.29$].

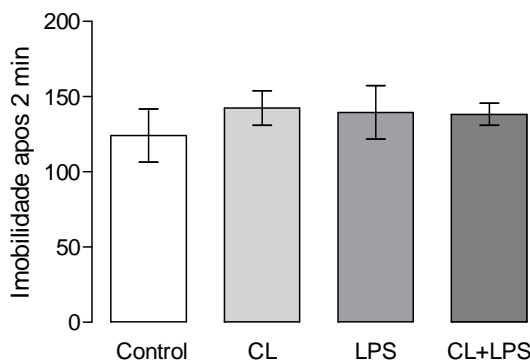


Figura 17. Tempo de imobilidade após 2 minutos= Teste do Nado Forçado. $p < 0.29$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.3.5 Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda também mede o tempo de imobilidade e é utilizado como sugestivo de depressão. Em nossos experimentos, todos os grupos tiveram comportamentos similares ao do grupo controle, portanto não houve detecção de comportamento depressivo em nenhum dos grupos avaliados [$F(0,91)=0,06$, $p=0,44$].

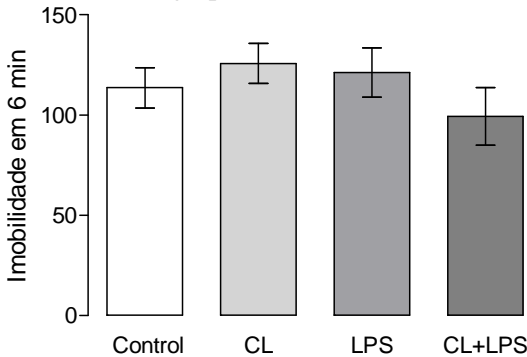


Figura 18. Tempo de imobilidade em 6 minutos. = Teste do Nado Forçado. $p < 0,44$ Teste de ANOVA e post-hoc Student-Newman-Keuls (N mínimo de 6 animais por grupo).

4.3.6 Análise Macroscópica do Encéfalo de camundongos machos na fase adulta

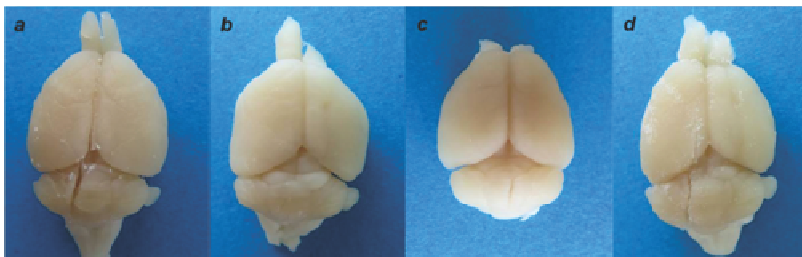


Figura 19. Efeitos da criolesão induzida no primeiro dia pós-natal (P0) sobre o neocórtex de camundongos machos adultos (3 meses de idade). (a-b) observação macroscópica de animais *sham* e CL respectivamente. (c-d) imagens macroscópicas do encéfalo de animais LPS e LPS+ CL.

Os grupos CL (fig. 10-b) e CL+LPS (fig.10-d) mostraram malformação do desenvolvimento cortical pelo efeito da criolesão em

P0. Não houve evidência de lesão cortical nos animais falso operados (fig.10-a) ou nos animais tratados somente com LPS (fig. 10c).

Nos camundongos CL, com ou sem indução inflamatória com LPS, encontramos a presença de microgiria de formatos variados porém com nítida redução da área superficial. Não observamos a presença de esquizencefalia em nenhuma das amostras.

As medidas da área superficial dos encéfalos dos animais criolesados (hemisfério direito) possuíam área até 10% menores quando comparados ao hemisfério esquerdo e foram estatisticamente diferentes nos grupos criolesados [$t=2.313$ $df=10$; $p=0.0433$] e nos animais CL submetidos a inflamação [$t=2.614$ $df=10$; $p=0.0259$]. A comparação da área superficial entre os hemisférios dos grupos controle e submetidos à inflamação não se mostraram diferentes.

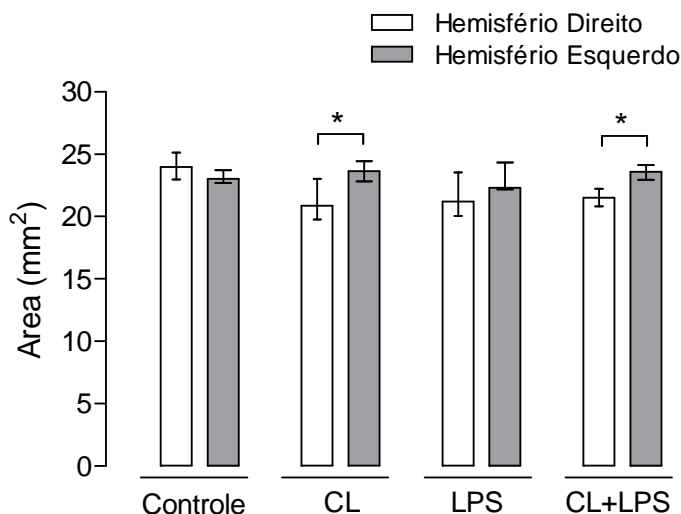


Figura 20. Área superficial dos encéfalos dos animais criolesados: até 10% menores quando comparados ao hemisfério esquerdo. Teste T não pareado. (N = mínimo de 6 animais por grupo)

5 DISCUSSÃO

Na fase 01 e 02 dos experimentos, os resultados que alcançaram significância estatística após administração sistêmica de LPS foram a hipotermia das gestantes 3 horas após injeção da solução pirogênica e a diminuição do número de neutrófilos no sangue materno. A produção de citocinas pró-inflamatórias se mostrou aumentada no soro materno e líquido amniótico. A submissão dos animais ao teste comportamental do Campo Aberto obteve significância estatística para a distância total percorrida e confirmou os achados da testagem leucocitária e da verificação da presença de citocinas pró-inflamatórias no soro materno, correlacionando-os ao comportamento doente que as fêmeas apresentaram 3 horas após a administração do LPS. Sob uma ótica clínica, estes dados (neutropenia, hipotermia e inflamação) confirmam que a administração do lipopolissacáride em animais de experimentação leva a alterações imunológicas importantes que se expressam tanto nos testes comportamentais quanto em exames laboratoriais. Segundo Svanes ⁷⁸ a neutropenia pode ocorrer em resposta a hipotermia. Este autor considera que a hipotermia leva a uma profunda diminuição da contagem total de mononucleares, neutrófilos maduros e eosinófilos, seguida de um aumento até os níveis normal entre 8 e 12 horas após a hipotermia.

Na fase 03, à mortalidade causada pela administração do LPS em E18, evidencia que a exposição materna ao lipopolissacáride causa mortalidade fetal, no entanto esta depende da dose, da potencialidade do LPS e da base genética do animal ⁷⁹. Elovitz e colegas ⁸⁰ definiram parto prematuro em camundongos como sendo aquele que ocorre no período igual ou anterior a 70% da gestação (o camundongo possui duração gestacional de 19 a 21 dias). Os animais do presente estudo, ao serem testados com a dose de 300µg/Kg apresentaram 100 % de aborto. As gestantes tratadas com 150µg/Kg de LPS apresentaram 55% de aborto espontâneo. De uma forma geral, a presença de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico avança para a possibilidade do contato das IL-1β e do TNF-α com o(s) feto(s) e aumentam a probabilidade de serem possíveis causadores de alguma modificação e/ou dano ao SNC fetal. Em recente estudo, Oksvig et al ⁸¹ injetaram 0.25 mg/kg de LPS em ratos Sprague–Dawley rats no E15. O mesmo observou elevação significativa das citocinas pró-inflamatórias no soro

materno e líquido amniótico 4 horas após administração de LPS. Semelhante ao nosso estudo, níveis significativos de marcadores inflamatórios foram identificados no cérebro fetal 4 horas após LPS. Uma análise do genoma destes fetos foi realizada em uma tentativa de elucidar os mecanismos moleculares que participam da ativação do sistema imune materno e como este afeta cérebro fetal. Neste, ao todo foram identificadas 3285 desregulações gênicas em categorias funcionais restritas que promoveram aumento da expressão do RNAm em resposta ao estresse celular fetal. Genes que expressam morte celular e diminuição da expressão de genes relacionados a regulação do desenvolvimento cerebral, em especial os que controlam a migração neuronal dos interneurônios GABAérgicos, incluindo o *Distal-less* (*Dlx*), foram identificados.

Os resultados obtidos através da verificação da temperatura e do teste comportamental do campo aberto sugerem que há uma resposta fisiológica de base dose-dependente ao LPS (ver referencia que apóiam esses resultados).

Uma grande diversidade de estudos investiga os efeitos do LPS nos compartimentos fetais, porém somente alguns testam prole em outras fases da vida^{80, 82-84}. Nota-se também que publicações que envolvem o procedimento cirúrgico da criolesão^{35, 36, 77, 85}, não englobam em sua metodologia um primeiro agravo na fase neonatal como a administração sistêmica de LPS. O diferencial deste trabalho está no fato de que sua metodologia engloba a junção de três agravos (sendo um perinatal e dois outros logo após o nascimento) e se estende até a fase adulta com a realização de testes comportamentais e análise anatomopatológica e macroscópica dos encéfalos. A junção de testes que avaliam o comportamento materno e também da prole masculina na fase adulta, a verificação da temperatura materna antes e após o LPS, a avaliação dos níveis séricos de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias das gestantes enriquece os resultados e conclusões obtidos por meio desta pesquisa. Uma limitação deste estudo é que não se obteve um número maior de animais para, após a curva dose-resposta, realizar a curva tempo-resposta. A curva tempo-resposta poderia revelar o pico de ação das citocinas pró-inflamatórias e talvez alterar os resultados obtidos durante a aplicação dos testes comportamentais na vida adulta.

Como demonstrado nos resultados, à diminuição da temperatura 3 horas após a administração do lipopolissacáride e estabelecimento de hipotermia obteve resultados significantes quando comparados ao grupo controle. Em recente estudo Fewell e colegas demonstraram que o LPS

pode produzir resposta sistêmica diferente que dependerão do estado fisiológico do animal. Para este autor a resposta fisiológica mais comumente encontrada após a administração do LPS é a hipertermia, no entanto mudanças no estado fisiológico tal como as ocasionadas pela gestação podem alterar esta resposta e levar ao estado hipotérmico especialmente logo antes do parto, onde ocorre a diminuição da atividade do centro de termoregulação do SNC ocasionando a diminuição da produção metabólica de calor, hipotensão e perda de calor ²⁹. Dogan *et al* ⁸⁶ determinou que o sorotipo da bactéria utilizada em estudos é crucial para determinar o tipo de resposta termorregulatória obtida em estudos realizados com roedores. Nesta pesquisa foi utilizada a cepa de *E.coli* O111:B4, que segundo os estudos deste autor, pode produzir tanto hipo quanto hipertermia ⁸⁶. O estado hipotérmico observado nesta pesquisa pode estar paralelamente relacionado ao aumento do TNF- α , sabidamente causador de hipotermia e significativamente alterado em nossos achados ⁸⁷.

Sabe-se que a exposição de animais a um ambiente novo, como o do campo aberto, pode ser estressante. Experimentos geradores de estresse podem levar ao aumento da adrenocorticotropina (ACTH) e da corticosterona que em roedores, podem causar inibição da resposta imunológica e, em particular, a liberação de citocinas como a IL-1 β e o TNF- α através da diminuição da atividade dos macrófagos ⁴. Mesmo diante das possíveis alterações determinadas pela presença de acontecimentos estressantes, como no caso da exposição ao teste do campo aberto, resultados significantes foram encontrados quando a distância total percorrida foi analisada. Estes resultados foram observados em todos os animais tratados com LPS. Alterações dose-dependentes foram observadas durante a análise da temperatura corporal 3 horas após administração do LPS.

A indução da produção de citocinas após a administração de LPS foi previamente demonstrada ⁷⁵. No presente estudo a determinação das interleucinas se deu em animais tratados com a dose de LPS de 150 μ g/Kg e a significância estatística foi obtida tanto para a interleucina1 β quanto para o TNF- α em ambos o soro materno e fluido amniótico.

Níveis elevados de TNF- α e IL-1 β estimulam a programação de morte neuronal e afetam a sobrevivência neuronal ⁷⁵. De acordo com Boksa, a administração de LPS ou poli IC a roedores durante a gestação pode claramente aumentar os níveis séricos de citocinas incluindo pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e produzir febre com posterior dano cerebral neonatal e posterior repercussão na vida adulta ⁶.

O TNF- α possui funções biológicas importantes para o desenvolvimento do SNC e função neural. Este está envolvido com a organização do crescimento dos neurônios bem como sua sobrevivência e com a regulação dos receptores de AMPA. O TNF- α pode ainda alterar a resposta térmica frente a uma inflamação, levando por sua vez a hipotermia através do mecanismo de interação com os receptores tipo 1 de TNF, regulados por hormônios esteróides femininos. A hipotermia leve é considerada protetora contra isquemia e danos tipo-isquêmicos. Com a redução da temperatura, ocorre a diminuição da atividade microglial que por sua vez também se mostra neuroprotetora⁸⁸. Quando a microglia é ativada, esta estimula a produção de citocinas e a secreção do glutamato, um aminoácido excitatório, que tem sua produção exacerbada na presença de hipertermia⁸⁹. Os achados encontrados neste estudo relacionados à hipotermia podem ser interpretados como um mecanismo de neuroproteção materna contra a isquemia provavelmente em resposta ao estado e estágio gestacional.

A função da IL-1 β é semelhante a do TNF- α em certos pontos como na modulação do desenvolvimento e função neuronal, no entanto o papel mais significativo da IL-1 β é regular a plasticidade sináptica⁷⁵. A expressão exacerbada destas citocinas no SNC pode contribuir para o desenvolvimento anormal do cérebro e aumentar a morte celular deste órgão em fases de desenvolvimento⁹⁰, causando dano ao tecido cerebral neonatal⁷⁵. A produção excessiva de IL-1 β é considerada neurotóxica em períodos de rápido desenvolvimento do SNC⁹¹. Neste estudo, o grupo de animais tratados com 150 μ g/Kg de LPS foi estatisticamente diferente do grupo controle em relação ao aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β três horas após administração dos tratamentos tanto no soro materno quando no fluido amniótico. A administração do LPS durante a gestação pode levar a sensibilização do cérebro em desenvolvimento e produzir um resultado negativo frente a qualquer outro agravo. Para Harnett *et al*⁸² animais expostos a níveis baixos ou moderados de dano cerebral não são estatisticamente diferentes do grupo controle e infecções ou inflamações discretas não estão associadas ao dano cerebral. Murthy e Kennea¹⁷ por sua vez, afirmam que há fortes evidências que a exposição ao LPS, mesmo em baixas doses, pode sensibilizar o cérebro. Em um estudo retrospectivo de base populacional, conduzido com 4742 pacientes, Sheiner *et al*⁸ mostrou que existe associação entre bacteriúria assintomática (baixos níveis de inflamação) e complicações gestacionais como restrição do crescimento intra-uterino que por sua vez poderia levar ao dano cerebral⁹². No presente estudo o LPS mostrou causar níveis pronunciáveis de

comportamento doentio nas gestantes uma vez que reduziu drasticamente a atividade locomotora dos animais de uma forma dose-dependente, mas não foi capaz de induzir alterações comportamentais de forma isolada ou associada a um *second hit*.

Na quarta fase dos experimentos, a prole dos animais submetidos a injeções de LPS e solução salina foi dividida em 4 grupos distintos: o grupo *sham* (gestantes tratadas com solução salina e prole sem CL), grupo CL (gestantes tratadas com solução salina e prole submetidas a CL), grupo LPS (gestantes tratadas com LPS e prole sem CL) e finalmente grupo LPS+ CL (gestantes tratadas com LPS e prole submetidas a CL). Já em fase adulta, os machos foram submetidos a testes comportamentais cuja função seria avaliar atividade locomotora e exploratória, de memória espacial, ansiedade e depressão em todos os grupos de tratamento.

No teste do campo aberto, que mede a atividade locomotora e exploratória de roedores, os resultados indicaram que não houve diferença estatística entre os grupos. Em um estudo feito somente com a administração de LPS, sem a junção de outros agravos, Golan *et al* investigou o comportamento da prole após administração sistêmica da solução pirogênica e avaliou as funções motoras e exploratórias através do teste do campo aberto: em seus resultados foram identificadas diferenças significantes entre o grupo tratado com LPS e o grupo controle com relação a distância percorrida ⁷⁵. Resultados similares foram encontrados por Chen *et al* em um modelo de inflamação materna e testagem comportamental da prole adulta, através da aplicação dos testes do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado ⁹³. Em nosso estudo, o teste do Labirinto em Cruz elevado revelou a existência de diferença significativa entre o tempo gasto nos braços fechados e o número de entradas e tempo total nos braços abertos nos grupos tratados com LPS e *Sham*. Entretanto, os grupos que demonstraram maior comportamento ansiogênico foram submetidos a anestesia por hipotermia. Estes dados parecem evidenciar que o procedimento de anestesia por hipotermia em P0 poderia ser um fator causador do comportamento ansiogênico, isolado ou associado a inflamação perinatal. No entanto há a necessidade de maiores estudos envolvendo sub-grupos de tratamentos uma vez que não há descrição deste tipo de teste em animais que foram submetidos a hipotermia nesta fase do desenvolvimento cortical.

No teste do labirinto em Y, cuja função é avaliar a memória espacial, observou-se uma tendência do grupo LPS+CL em ser diferente do grupo LPS. A tendência na repetição das entradas em determinados

braços pode significar que há uma discreta redução da capacidade de armazenamento da memória de curta-duração, porém este achado é bastante inconclusivo e dificulta a perfeita discussão sobre o tema.

Em seu estudo, Paiva *et al*, administrou LPS por via intraperitoneal em machos adultos e os submeteu ao teste do nado forçado e suspensão pela cauda. Os resultados obtidos mostraram aumento do tempo de imobilidade no grupo tratado com a solução pirogênica, sugerindo uma tendência depressiva ou comportamento doentio após aplicação do LPS ⁹⁴. Em nosso modelo, a administração neonatal de LPS e a junção de outro agravo não foram suficientes para demonstrar resultados significantes com relação ao tempo de imobilidade em nenhum dos grupos de tratamento.

A unicidade deste modelo de inflamação aliado a criolesão torna a comparação com outros modelos que envolvem unicamente a inflamação ou somente a lesão isquêmica, de difícil tarefa. Logo, ao reportarmos os resultados obtidos neste estudo, vê-se a necessidade de discutir sobre a neuroplasticidade uma vez que processos de reparação cerebral parecem estar envolvidos na gênese da recuperação funcional e emocional efetiva que os animais deste estudo apresentaram nos testes comportamentais utilizados.

O desenvolvimento cortical é um processo complexo, dividido em três etapas sobrepostas chamadas de proliferação celular, migração neuronal, organização cortical ^{34, 35, 95}.

Em comparação com outros mamíferos, os roedores nascem em estágios relativamente mais imaturos quando o córtex ainda encontra-se incompleto e a maioria das células corticais não migrou para suas posições finais. O período pós-natal inicial é representado pela primeira semana de vida e corresponde a um período que muitos outros mamíferos, incluindo o ser humano, encontram-se intra-útero ⁹⁶. Roedores, nos primeiros dias de vida, possuem desenvolvimento cortical semelhante ao de um ser humano entre o quarto e quinto mês de gestação ⁴¹. Durante o processo de formação da placa cortical, a camada IV é mais plástica e lesões envolvendo essa região modificam a disposição da arborização sináptica tálamo-corticais; alterando assim a disposição do córtex. Este tipo de alteração pode ser observada somente se a lesão for induzida antes do P4 ⁹⁷. Durante a primeira semana pós-natal a plasticidade cortical em ratos é mais intensa: este fato pode ser detectado utilizando métodos fisiológicos, anatômicos e comportamentais ⁹⁸. Existe uma breve janela de tempo durante o desenvolvimento cortical no qual o cérebro é hábil em compensar danos ⁹⁶ e esta parece ser a janela que propiciou a boa recuperação motora, de

memória espacial e de emocionalidade observada nos animais desta pesquisa.

O modelo de criolesão (CL) tem sido utilizado como modelo de déficit de memória espacial e aprendizagem ⁴¹. No entanto o teste do Labirinto em Y não mostrou diferença entre os grupos criolesados e os que não passaram por tal procedimento. Déficit da memória de curto prazo e do processamento auditivo rápido também foram descritos diante do emprego desta técnica ^{42, 43}.

Ambrosin *et al* mostram que após lesões unilaterais extensas do córtex motor, similares aos da criolesão, a representação neuronal da região motora primária pode ser reorganizada na região ipsilateral do hemisfério não lesionado ⁹⁹.

Em 2 estudos realizados 1987 e 1998, Kolb *et al* mostraram que o dano do córtex frontal durante o período de migração neuronal e sinaptogênese, em geral, determinava uma pobre recuperação funcional entre P0 e P6 e lesões provocadas na segunda semana de vida, período de máximo crescimento dendrítico e sinaptogênese intensa, estavam associada a uma melhor recuperação ⁴⁷. Em 2004, Kolb e cols, mostraram novos resultados onde lesões adquiridas durante a janela de desenvolvimento entre P1 e P6 resultariam em uma compensação funcional mais discreta ⁴⁸. Resultados semelhantes foram obtidos por Giza *et al* que mostraram que a ocorrência de insultos hipóxico-isquêmicos em P2 e P3 estão relacionados a um prognóstico mais favorável: filhotes que foram lesionados P2 e P3 (fase de desenvolvimento cortical) mostraram-se mais resistentes a adversidades quando comparados a filhotes cujos insultos foram sofridos em P7 a P10 ¹⁰⁰. Da mesma forma, em 2006, Kolb e Gibb publicam uma revisão a cerca da plasticidade cerebral e nela relatam um experimento que mostrou boa recuperação funcional dos comportamentos motores e cognitivos envolvendo dano cerebral (hemidecorticação) em P0. Neste estudo, o número de arborizações dendríticas na região afetada foi grande e o córtex mostrou-se mais grosso (possuía mais camadas) do que o esperado. Apesar dos novos resultados, os pesquisadores não souberam afirmar se a presença de um número maior de células no local da lesão possuía de fato um papel funcional; a afirmação da funcionalidade das células descobertas não pôde ser confirmada ¹⁰¹.

Para Anderson e colegas ⁵⁴, os resultados neuronais e funcionais relacionados ao dano cerebral em fases críticas do desenvolvimento nem sempre são consistentes.

Embora os mecanismos que norteiam as janelas de desenvolvimento não estejam completamente elucidados, através de

modelos animais descobriu-se que fatores como maturação vascular, excitotoxicidade e processos metabólicos e energéticos estão envolvidos¹⁰⁰. É importante considerar que a organização cerebral não é estática e vários são os determinantes que podem influenciar na recuperação do dano cerebral: não se sabe ainda com exatidão como estes mecanismos atuam para reparar uma lesão, pode-se afirmar, no entanto, que as adversidades ambientais possuem papel determinante nesta recuperação. A relação entre plasticidade cerebral e comportamento ainda é interpretada de forma correlacional isto dificulta a interpretação crítica dos fatos que delineiam a descrição exata das etapas da recuperação cerebral⁶⁴.

Um estudo desenvolvido com 12 pacientes cujo diagnóstico foi de hemiplegia congênita (HC) - outro tipo de lesão que geraria anormalidades no desenvolvimento cortical - descreve que a maioria dos portadores de HC, cuja lesão ocorrida foi próxima a 24ª semana intra-uterina, apresentou níveis cognitivos normais¹⁰². Neste estudo, a análise dos encéfalos mostrou discreta mudança na região do córtex somatossensorio dos animais submetidos à criolesão. Embora os testes comportamentais mostrem que não houve prejuízo para as funções avaliadas, pode-se observar discreta polimicrogiria (PMG) nos encéfalos de alguns dos animais submetidos a CL e LPS+CL. Teixeira *et al*¹⁰³ investigando características clínicas em 40 pacientes com o quadro de PMG observaram rendimento motor e cognitivo normais em 65% e 72% dos casos, respectivamente. Estudos clínicos como os supracitados, reforçam os resultados do presente estudo, onde observamos uma boa recuperação funcional expressa pela manutenção da capacidade locomotora e memória espacial mesmo diante de uma lesão encefálica induzida em certas janelas do desenvolvimento e da soma de outros agravos.

Ainda não se sabe ao certo se indivíduos com anormalidade do desenvolvimento cortical (ADC) (observados nos encéfalos de alguns animais dos grupos CL e LPS+CL do presente estudo) poderiam estar mais propensos a desenvolver quadros emocionais patológicos, tais como depressão se quando submetidos a situações de estresse contínuo. Em relação à emocionalidade, as ADC modificam algumas estruturas cerebrais e nelas produzem-se lesões permanentes que poderão afetar a qualidade de vida do indivíduo em diversas fases de seu desenvolvimento. Os resultados obtidos nos testes comportamentais deste estudo são sugestivos de que os quatro grupos do estudo (Sham, LPS, CL e LPS+CL) tiveram um desenvolvimento relativamente normal que culminou em um amadurecimento funcional adequado do sistema

nervoso central. Todos os grupos mostraram habilidades motoras e de memória espacial semelhantes ao grupo controle. Estudos direcionados a avaliar várias etapas do desenvolvimento mostraram que a idade em que um animal é testado pode determinar modificações nos resultados obtidos em testes comportamentais. Em seus estudos Salari e colegas¹⁰⁴, concluíram que os efeitos da administração materna de LPS poderiam ter consequências no decurso do desenvolvimento e que a idade seria um fator importante ao se analisar doenças de ordem neuropsiquiátricas.

Em suma, este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto da inflamação perinatal em roedores submetidos à anormalidades do desenvolvimento cortical (criolesão) e obteve resultados bastante expressivos com relação a avaliação de parâmetros clínicos relacionados a inflamação no período gestacional. A avaliação comportamental na fase adulta da prole de camundongos tratados com LPS e solução salina aliada a CL mostrou boa recuperação funcional, evidenciando que os grupos estudados tiveram um desenvolvimento relativamente normal que culminou em um amadurecimento do estado físico do sistema nervoso central até a idade de adultos jovens, apesar da nítida alteração neuroanatômica do hemisfério criolesado.

CONCLUSÃO

Foram observadas alterações imunológicas três horas após a administração de LPS com o aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α tanto no soro materno quando no líquido para ambas citocinas.

Animais tratados com as doses de 50, 150 e 300 μ g/Kg de LPS não demonstraram sinais de corioamnionite e alterações anatomopatológicas da placenta apesar de observarmos a presença de agentes inflamatórios no líquido amniótico.

A associação do *second hit* (criolesão) sobre alterações comportamentais na vida adulta em animais submetidos a um processo de inflamação induzida pelo LPS no período perinatal mostrou boa recuperação ou compensação funcional, evidenciando que os grupos estudados tiveram um desenvolvimento relativamente normal que culminou em um amadurecimento funcional adequado do sistema nervoso central.

Animais submetidos à hipotermia, associado ou não a inflamação intra-útero mostraram-se mais ansiosos quando comparados aos demais grupos.

A análise macroscópica dos encéfalos dos animais tratados apenas com LPS e os do Grupo *sham* não mostraram ter lesões aparentes inter-hemisféricas e entre os grupos. Os grupos CL e LPS+CL mostraram ter desenvolvido lesões de tamanho variável com a presença de um microgiro.

Os resultados futuros de exame anatomopatológico microscópico e imuno hístóquímicos nos grupos estudados poderão elucidar os possíveis mecanismos compensatórios envolvidos com a neuroplasticidade relacionados ao desfecho comportamental na vida adulta de animais sobre a atividade motora, exploratória, e memória espacial.

Há a necessidade de novas pesquisas clínicas e experimentais envolvendo hipotermia e inflamação para avaliar o comportamento ansioso observado neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang X, Hagberg H, Zhu C, Jacobsson B, Mallard C. Effects of intrauterine inflammation on the developing mouse brain. *Brain Res.* 2007;1144:180-5.
2. Menon R, Taylor RN, Fortunato SJ. Chorioamnionitis – A complex pathophysiologic syndrome. *Placenta* 2010;31:113–20.
3. Gavilanes AWD, Strack E, Kramer BW, Gantert M, Hove DVd, Steinbusch H, et al. Chorioamnionitis induced by intraamniotic lipopolysaccharide resulted in an interval-dependent increase in central nervous system injury in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(4):437 e1-8.
4. Engeland CG, Nielsen DV, Kavaliers M, Ossenkopp KP. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. *Physiol Behav.* 2001;72:481-91.
5. Escobar M, Crouzin N, Cavalier M, Quentin J, Roussel J, Fabien Lanté, et al. Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. *Biol Psychiatry.* 2011;70(10):992-9.
6. Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain Behav Immun.* 2010;24(6):881–97.
7. Yager JY, Ashwal S. Animal Models of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Pediatr Neurol.* 2009;40(3):156-67.
8. Sheiner E, Mazor-Drey E, Levy A. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22 (5):423–7.
9. Smith S, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson P. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci* 2007;27(40):10695-702.
10. Pang Y, Fan L-W, Zheng B, Cai Z, Rhodes PG. Role of interleukine-6 in lipopolysaccharide-induced brain injury and behavioral dysfunction in neonatal rats *Neuroscience* 2006;141:745–55.
11. Fofie AE, Fewell JE, Moore SL. Pregnancy influences the plasma cytokine response to intraperitoneal administration of bacterial endotoxin in rats. *Exp Physiol.* 2005 Jan;90(1):95-101.
12. Lasala N, Zhou H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. *J Neuroimmunol.* 2007 Sep;189(1-2):95-101.

- 13.Celik H, Ayar A. Effects of erythromycin on pregnancy duration and birth weight in lipopolysaccharide-induced preterm labor in pregnant rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002;103: 22–5.
- 14.Cuschieri J, Billigren J, Maier RV. Endotoxin tolerance attenuates LPS-induced TLR4 mobilization to lipid rafts: a condition reversed by PKC activation. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1289-97.
- 15.Bennett WA, Terrone DA, Rinehart BK, Kassab S, James N. Martin, Granger JP. Intrauterine endotoxin infusion in rat pregnancy induces preterm delivery and increases placental prostaglandin F2 α metabolite levels. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(6):1496-501.
- 16.Elovitz MA, Mrinalini C. Animal models of preterm birth. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(10):479-87.
- 17.Murthy V, Kennea NL. Antenatal infection/inflammation and fetal tissue injury. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21(3):479–89.
- 18.Choi C, Kim B, Hong J, Kim E, Kim H, Choi J. Bronchopulmonary dysplasia in a rat model induced by intra-amniotic inflammation and postnatal hyperoxia: morphometric aspects. *Pediatr Research.* 2009;65(5):323-7.
- 19.Chau V, Poskitt KJ, McFadden DE, Bowen-Roberts T, Synnes A, Brant R, et al. Effect of chorioamnionitis on brain development and injury in premature newborns. *Annals of Neurology.* 2009;66(2):155-64.
- 20.Been JV, Rours IGIJG, Kornelisse RF, Passos VL, Kramer BW, Schneider TAJ, et al. Histologic chorioamnionitis, fetal involvement, and antenatal steroids: effects on neonatal outcome in preterm infant. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201(6): 587.e1-.e8.
- 21.Rousset CI, Kassem J, Olivier P, Chalon S, Gressens P, Saliba E. Antenatal bacterial endotoxin sensitizes the immature rat brain to postnatal excitotoxic injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Oct;67(10):994-1000.
- 22.Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem.* 2005;51(3):280-7.
- 23.Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol.* 1998;64:25-32.
- 24.Kirsten TB. Avaliação Comportamental e Neuroquímica da prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao lipopolissacarídeo [Dissertação]. São Paulo: USP; 2008.
- 25.Kirsten TB, Taricano M, Flório JC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces motor activity after an immune challenge in adult male offspring. *Behav Brain Res.* 2010;211(1):77–82.
- 26.Zager A, Andersen ML, Lima MMS, Reksidler AB, Machado RB, Tufik S. Modulation of sickness behavior by sleep: The role of

- neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009;19(8):589–602.
27. Dunn AJ. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. *Clin Neurosci Res.* 2007;6:52-68.
28. Lowe GC, Luheshi GN, Williams S. Maternal infection and fever during late gestation are associated with altered synaptic transmission in the hippocampus of juvenile offspring rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1563–71.
29. Fewell JE, Liu-Tertilt L, Alexander BN, Aleh A. Bacterial endotoxin induced hypothermia in pregnant rats: Role of tumor necrosis factor- α . *J Thermal Biol.* 2010;35:360–5.
30. Ruggieri PM, Najm I, Bronen R, Campos M, Cendes F, Duncan JS, et al. Neuroimaging of the cortical dysplasias. *Neurology.* 2004;62:S27-S9.
31. Barkovich AJ. Malformations of neocortical development: magnetic resonance imaging correlates. *Curr Opin Neurol.* 1996 Apr;9(2):118-21.
32. Barkovich AJ, Kuzniecky RI. Neuroimaging of focal malformations of cortical development. *J Clin Neurophysiol.* 1996 Nov;13(6):481-94.
33. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics.* 1996 Apr;27(2):59-63.
34. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology.* 2005 Dec 27;65(12):1873-87.
35. Barkovich AJ, Raybaud CA. Malformations of cortical development. *Neuroimaging Clin N Am.* 2004 Aug;14(3):401-23.
36. Luhmann HJ, Raabe K. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res.* 1996 Dec;26(1):67-74.
37. Rosen GD, Press DM, Sherman GF, Galaburda AM. The development of induced cerebrocortical microgyria in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992 Nov;51(6):601-11.
38. Hablitz JJ, DeFazio T. Excitability changes in freeze-induced neocortical microgyria. *Epilepsy Res.* 1998 Sep;32(1-2):75-82.
39. Peiffer AM, Fitch RH, Thomas JJ, Yurkovic AN, Rosen GD. Brain weight differences associated with induced focal microgyria. *BMC Neuroscience.* 2003;4:1-12.
40. Marroni SS, Nakano FN, Gati CD, Oliveira JA, Antunes-Rodrigues J, Garcia-Cairasco N. Neuroanatomical and cellular substrates of hypergrooming induced by microinjection of oxytocin in central nucleus

- of amygdala, an experimental model of compulsive behavior. *Mol Psychiatry*. 2007 Dec;12(12):1103-17.
- 41.Scantlebury MH, Gibbs SA, Foadjo B, Lema P, Psarropoulou C, Carmant L. Febrile seizures in the predisposed brain: a new model of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 2005 Jul;58(1):41-9.
 - 42.Rosen GD, Water NS, Galaburda AM, Denenberg VH. Behavioral consequences of neonatal injury of the neocortex. *Brain Research*. 1995;681:177-89.
 - 43.Rial D, Xikota JC, Miozzo A, Cruz VE, Prediger RD, Walz R. Differential gender-related susceptibility to learning and memory deficits in mice submitted to neonatal freezing microgyria model. *Brain Res Bull*. 2009 May 29;79(3-4):177-81.
 - 44.Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci Res*. 2007 Nov;59(3):288-95.
 - 45.Villablanca JR, Hovda DA, Jackson GF, Infante C. Neurological and behavioral effects of a unilateral frontal cortical lesion in fetal kittens. II. Visual system tests, and proposing an "optimal developmental period" for lesion effects. *Behav Brain Res*. 1993 Oct 21;57(1):79-92.
 - 46.Kolb B, Cioe J, Muirhead D. Cerebral morphology and functional sparing after prenatal frontal cortex lesions in rats. *Behav Brain Res*. 1998;91(1-2):143-55.
 - 47.Kolb B, Elliott W. Recovery from early cortical damage in rats. II. Effects of experience on anatomy and behavior following frontal lesions at 1 or 5 days of age. *Behav Brain Res*. 1987 Oct;26(1):47-56.
 - 48.Kolb B, Pellis S, Robinson TE. Plasticity and functions of the orbital frontal cortex. *Brain Cogn*. 2004 Jun;55(1):104-15.
 - 49.Eklind S, Mallard C, Leverin A-L, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, et al. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic-ischaemic injury. *Eur J Neurosci*. 2001;13(6):1101-6.
 - 50.Redline RW. Thrombophilia and Placental Pathology. *Clin Obstet Gynecol*. 2006;49(4):885-94.
 - 51.Giannone P, Nankervis C, Richter J, Schanbacher B, Reber K. Prenatal lipopolysaccharide increases postnatal intestinal injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009;48(3):276-82.
 - 52.Jansen A, Andermann E. Genetics of the polymicrogyria syndromes. *J Med Genet*. 2005;42(5):369-78.
 - 53.Galaburda AM, LoTurco J, Ramus F, Fitch RH, Rosen GD. From genes to behavior in developmental dyslexia

- Albert M Galaburda, Joseph LoTurco, Franck Ramus, R Holly Fitch & Glenn D Rosen. *Nature Neuroscience* Volume 9. 2006;10.
54. Anderson V, Spencer-Smith M, Wood A. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. *Brain* 2011;134:2197–221.
55. Kolb B, Muhammad A, Gibb R. Searching for factors underlying cerebral plasticity in the normal and injured brain. *Journal of Communication Disorders* 2011;44:503–14.
56. Gudsnek KMA, Champagne FA. Epigenetic Effects of Early Developmental Experiences. *Clin Perinatol* 2011;38:703–17.
57. Uylings H. Development of the human cortex and the concept of critical or sensitive periods Oxford Blackwell Publishing 2006:59-90.
58. Kolb B, Brown R, Witt-Lajeunesse A, Gibb R. Neural compensations after lesion of the cerebral cortex. *Neural plasticity*. 2001;8(1-2):1-16.
59. Hablitz JJ, DeFazio RA. Altered receptor subunit expression in rat neocortical malformations. *Epilepsia*. 2000;41 Suppl 6:S82-5.
60. Cepeda C, Andre VM, Levine MS, Salamon N, Miyata H, Vinters HV, et al. Epileptogenesis in pediatric cortical dysplasia: the dysmature cerebral developmental hypothesis. *Epilepsy Behav*. 2006 Sep;9(2):219-35.
61. Jansen LA, Peugh LD, Ojemann JG. GABA(A) receptor properties in catastrophic infantile epilepsy. *Epilepsy Res*. 2008 Oct;81(2-3):188-97.
62. Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A, et al. Changes in the expression of cation-Cl cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neuroscience Research* 2007;59 (288–295).
63. Gonzales CR, Kobe B. A comparison of different models of stroke on behavior and brain. *Eur J Neurosci*. 2003;18:1950-2.
64. Kolb B, Teskey GC, Gibb R. Factors influencing cerebral plasticity in the normal and injured brain. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2010;4:1-12.
65. Rosen GD, Galaburda AM. Single cause, polymorphic neuronal migration disorders: an animal model. *Dev Med Child Neurol*. 2000 Oct;42(10):652-62.
66. Bourgeois JP. Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Paediatr* 1997;422:27-33.
67. Bystron I, Molnár Z, Otellin V, Blakemore C. Tangential networks of precocious neurons and early axonal outgrowth in the embryonic human forebrain. *J Neurosci*. 2005;25:2781-92.

68. Garcia-Moreno F, Lopez- Mascaraque L, De Carlos JA. Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells J Comp Neurol. 2007;500(3):419-32.
69. Gressens P. Mechanisms and disturbances of neuronal migration. *Pediatr Research*. 2000;48(6):725-30.
70. Zhu C, Wang X, Xu F, Bahr BA, Shibata M, Uchiyama Y, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*. 2005;12(2):162-76.
71. Kolb B, Gibb R. Brain plasticity and recovery from early cortical injury. *Dev Psychobiol*. 2007 Mar;49(2):107-18.
72. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977 Apr 21;266(5604):730-2.
73. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.
74. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.
75. Golan HM, Lev V, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology* 2005:01-15.
76. Phifer CB, Terry LM. Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol Behav*. 1986;38(6):887-90.
77. Xikota JC, Rial D, Ruthes D, Pereira R, Figueiredo CP, Prediger RD, et al. Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein. *Brain Res*. 2008 Nov 19;1241:148-56.
78. Svanes K. Studies in Hypothermia. 3. The Influence of Prolonged Deep Hypothermia and of Barbiturate Anaesthesia on the Blood Leukocytes in Mice. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1964;8:167-79.
79. Lasala N, Zhou H. Effects of maternal exposure to LPS on the inflammatory response in the offspring. *J Neuroimmunol*. 2007;189(1-2): 95-101
80. Elovitz MA, Brown AG, Breen K, Anton L, Maubert M, Burd I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 2011;xx:xxxx.
81. Oskvig DB, Elkahoun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the

fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 2012 Jan 30;xx(xx):xx-x.

82.Harnett EL, Dickinson MA, Smith GN. Dose-dependent lipopolysaccharide-induced fetal brain injury in the guinea pig. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(2):179 e1-7.

83.Tsang M, Fewell JE, Moore SL. LPS induced hypothermia in pregnant rats: A regulated thermoregulatory response. *Physiol Behav*. 2006;89(2):235–40.

84.Blanqué R, Meakin C, Millet S, Gardner CR. Hypothermia as an Indicator of the Acute Effects of Lipopolysaccharides: Comparison with Serum Levels of IL1-beta, IL6 and TNF-alpha. *Gen Pharmac*. 1996;27:973-7.

85.Dvorak K, Feit J, Juránková Z. Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats--pathogenesis and interrelation. Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol*. 1978;44(2):121-9.

86.Dogan M, Ataoglu H, Eyup S. Akarsu. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sci*. 2000;67:2319-29.

87.Dogan MD, Ataoglu H, Akarsu ES. Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;72(1-2):143–50.

88.Schmitt KRL, Diestel A, Lehnardt S, Schwartlander R, Lange PE, Berger F, et al. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *J Neuroimmunol*. 2007;189:7–16.

89.Webster CM, Kelly S, Koike MA, Chock VY, Giffard RG, Yenari MA. Inflammation and NFκB activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2009;33(2):301–12.

90.Zhou H. Mechanistic links between maternal bacterial infection and cerebral palsy. *Biotechnol Mol Biol Rev*. 2008;3:14-23.

91.Hodyl NA, Krivanek KM, Lawrence E, Clifton VL, Hodgson DM. Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *J Neuroimmunol*. 2007;190(1-2):61–71.

92.Yanney M, Marlow N. Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004;9(5): 411-8.

93.Chen G-H, Wang H, Yang Q-G, Tao F, Wang C, Xu D-X. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged CD-1 mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy. *Behav Brain Res*. 2011;218:267–79.

94. Paiva VNd, Lima SNP, Fernandes MM, Roseli Soncin, Andrade CAF, Giusti-Paiva A. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav Brain Res*. 2010;215:146–51.
95. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology*. 2001;57(12):2168–78.
96. Kolb B, Gibb R, Gorny G. Cortical plasticity and the development of behavior after early frontal cortical injury. *Dev Neuropsychol*. 2000;18(3):423–44.
97. Fox K. The origin of cortical surround receptive fields studied in the barrel cortex. *Neuroscience*. 2003;23(23):8380–91.
98. Fox K. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*. 2002;111(4):799–814
99. Ambrosini A, Louin G, Croci N, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Characterization of a rat model to study acute neuroinflammation on histopathological, biochemical and functional outcomes. *J Neurosc Methods* 2005;144:183–91.
100. Giza CC, Kolb B, Harris NG, Asarnow RF, Prins ML. Hitting a Moving Target: Basic Mechanisms of Recovery from Acquired Developmental Brain Injury. *Dev Neurorehabilitation*. 2009;12(5):255–68.
101. Kolb B, Gibb R. Brain Plasticity and Recovery from Early Cortical Injury. Canadian Centre for Behavioural Neuroscience. 2006;49:107–18.
102. Guzzetta A, Bonanni P, Biagi L, Tosetti M, Montanaro D, Guerrini R, et al. Reorganisation of the somatosensory system after early brain damage. *Clin Neurophysiol*. 2007 May;118(5):1110–21.
103. Teixeira KC, Montenegro MA, Cendes F, Guimaraes CA, Guerreiro CA, Guerreiro MM. Clinical and electroencephalographic features of patients with polymicrogyria. *J Clin Neurophysiol*. 2007 Jun;24(3):244–51.
104. Enayati M, Solati J, Hosseini MH, Shahi HR, Saki G, Salari AA. Maternal infection during late pregnancy increases anxiety- and depression-like behaviors with increasing age in male offspring. *Brain Res Bull*. 2011;87(2-3):295–302.

ANEXO